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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DO
BIVALVE ENDÊMICO *Diplodon expansus* ANTES E APÓS
EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ATRAZINA**

LARISSA ROSA NOGAROL

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências do Câmpus
de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas
(Biologia Celular e Molecular).

Fevereiro - 2012

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS DO
BIVALVE ENDÊMICO *Diplodon expansus* ANTES E APÓS
EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ATRAZINA**

LARISSA ROSA NOGAROL

Orientadora: Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti

Co-orientadora: Profa. Dra. Ana Luiza Brossi-Garcia

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

**Rio Claro
Estado de São Paulo – Brasil
Fevereiro - 2012**



591.4 Nogarol, Larissa Rosa
N775c Caracterização morfológica das brânquias do bivalve
endêmico *Diplodon expansus* antes e após exposição ao
herbicida atrazina. / Larissa Rosa Nogarol. - Rio Claro : [s.n.],
2012
109 f. : il., figs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti
Co-Orientador: Ana Luiza Brossi-Garcia

1. Anatomia comparada. 2. Mexilhão. 3. Pesticida. 4.
Histologia. 5. Ultramorfologia. 6. Ultraestrutura. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS BRÂNKUIAS DO BIVALVE ENDÊMICO
Diplodon expansus ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA ATRAZINA

AUTORA: LARISSA ROSA NOGAROL

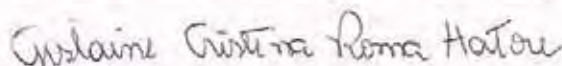
ORIENTADORA: Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ANA LUIZA BROSSI GARCIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR) , pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. CARMEM SILVIA FONTANETTI CHRISTOFOLETTI
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro / UNESP



Profa. Dra. GISLAINE CRISTINA ROMA
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro / UNESP



Profa. Dra. ANALUEGYDIO JACOMINI
Centro Universitario UNISEB

Data da realização: 16 de fevereiro de 2012.

Ser feliz é extrair das pequenas coisas grandes emoções. É encontrar todos os dias motivos para sorrir, mesmo se não existirem grandes fatos. É rir de suas próprias tolices. É não desistir de quem se ama, mesmo se houver decepções. É ter amigos para repartir as lágrimas e dividir as alegrias. É agradecer a Deus pelo espetáculo da vida...

Augusto Cury

Aos meus amados pais, dedico.

AGRADECIMENTOS

Meu agradecimento especial é para DEUS, o responsável por iluminar meus caminhos e encher-me de força e coragem para continuar lutando pelos meus sonhos.

Gostaria de agradecer aos meus amados pais, José e Genesaré, por estarem sempre dispostos a me ajudar, dando-me apoio e incentivo principalmente nos momentos de dificuldades. A minha querida irmã Vanessa por sempre torcer pela minha vitória e felicidade.

À minha orientadora Profa. Dra. Carmem S. Fontanetti Christofolletti pelos ensinamentos durante minha iniciação científica e mestrado, aos técnicos e amigos Mônica Iamonte, Antônio Yabuki e Gerson de Souza por estarem sempre prontos a ajudar, à desenhista Cristiane Mileo pela ajuda com as ilustrações, ao Prof. Dr. José Augusto de Oliveira David, à Profa. Dra. Maria Izabel Camargo Mathias e ao Dr. Pablo Henrique Nunes pelas importantes sugestões neste trabalho, ao Prof. Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar e à Profa. Dra. Cláudia Tasso Callil pelo auxílio com a identificação dos espécimes.

Meus sinceros agradecimentos aos meus amigos do grupo de pesquisa, Cintya Christofolletti, Janaína Pedro-Escher, Tamariz Pinheiro, Dânia Mazzeo, Raphael de Souza, Ana Claudia Marcato, Cristina de Sousa, Vanessa Merlini, Jorge Correia, Júlia Marinho, Annelise Francisco e Amanda Batista pela ajuda e pelos bons momentos que passamos juntos.

Agradeço, com muito carinho, aos meus amigos do programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) Franco Campos Pereira, Vlamir Bozzatto, Andrea Mendes, Edmara Nico e a nossa “agregada” Dhara Barbosa por terem feito parte da minha vida durante esses anos. Sucesso a todos nós. A vida nos reserva muitas felicidades.

Ao Marcos Perdiza pela ajuda durante as coletas e pela amizade.

À Profa. Dra. Ana Luiza Brossi Garcia pela ajuda durante o desenvolvimento desse projeto.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

	Página
1. RESUMO.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUÇÃO.....	3
4. OBJETIVOS.....	8
5. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
5.1. Bivalves da família Hyriidae: características gerais e estudos realizados.....	9
5.2. A utilização de moluscos bivalves em estudos ecotoxicológicos.....	14
5.3. Herbicida atrazina e seus efeitos sobre a biota aquática.....	18
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
6.1. Coleta dos animais.....	23
6.2. Análise química da água.....	23
6.3. Montagem dos bioensaios.....	24
6.4. Histologia.....	25
6.5. Histoquímica.....	25
6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
6.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	27
6.8. Análise estatística.....	27
7. RESULTADOS.....	28
7.1. Capítulo 1.....	29
Morphological and histochemical characterization of gill filaments of the Brazilian endemic bivalve <i>Diplodon expansus</i> (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae).	
7.2. Capítulo 2.....	50
Surface morphology of <i>Diplodon expansus</i> (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide	

7.3. Capítulo 3.....	59
Histopathology of the gill filaments of the Brazilian endemic bivalve <i>Diplodon expansus</i> after exposure to the herbicide atrazine	
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	92
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

1. RESUMO

Atualmente o aumento do uso de espécies nativas nas avaliações ambientais e a utilização de biomarcadores morfológicos associados têm propiciado avaliações toxicológicas ecologicamente mais precisas. Neste contexto, moluscos bivalves têm sido amplamente utilizados em estudos toxicológicos, por apresentarem uma série de características que os tornam, em princípio, bons indicadores biológicos como, o hábito sésil e filtrador, a fácil coleta e identificação e a ampla ocorrência e distribuição. *Diplodon expansus* (Kuster, 1856) é uma espécie nativa de bivalve encontrada em sítios da Bacia do Corumbataí, São Paulo, Brasil, região de crescente desenvolvimento industrial e agrícola, onde predomina a cultura de cana-de-açúcar. Neste sentido, o presente estudo analisou o potencial bioindicador do bivalve nativo *D. expansus*, por meio da utilização da histopatologia das brânquias, a fim de analisar os possíveis efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes do herbicida atrazina, comumente utilizado na cultura de cana-de-açúcar e que apresenta grande potencial de contaminação de corpos d'água. Inicialmente foi realizada a caracterização histológica e histoquímica das brânquias e o estabelecimento do padrão morfológico dos animais do grupo controle. Após exposição aguda a diferentes concentrações do herbicida atrazina sob condições laboratoriais controladas, foi realizada análise histopatológica das brânquias, incluindo técnicas histoquímicas, ultramorfológica e ultraestrutural. A análise morfológica dos filamentos branquiais desta espécie revelou a existência de uma estrutura de sustentação especializada, a haste de sustentação, ainda não descrita na literatura. Por meio das análises histopatológicas, foram observadas alterações relacionadas à proteção e ao dano das células e demais estruturas que constituem os filamentos branquiais, bem como indícios de maior gasto energético, provavelmente devido à ativação de dispendiosos processos de detoxificação. Tais alterações foram mais diversificadas e frequentes nos animais expostos a maiores concentrações do herbicida, revelando uma resposta dose-dependente. Desta forma, esse trabalho alerta para o perigo da utilização indiscriminada desse herbicida do ponto de vista ecotoxicológico, visto que pode causar alterações morfológicas prejudiciais à saúde e ao desempenho de representantes da malacofauna endêmica.

Palavras-chave: mexilhão; pesticida; brânquias; histologia; histoquímica; ultramorfologia; ultraestrutura.

2. ABSTRACT

Currently, the increased use of native species in environmental assessments and the use of associated morphological biomarkers have provided more accurate ecotoxicological assessments. In this context, bivalve molluscs have been widely used in toxicological studies, by presenting a series of characteristics that make them in principle good biological indicators, such as sessile and filter feeders habits, easy collection and identification and wide occurrence and distribution. *Diplodon expansus* (Kuster, 1856) is a native species of mussel found in sites of Corumbataí Basin, São Paulo, Brazil, a region of increasing industrial and agricultural development, dominated by sugar cane culture. In this sense, the present study examined the bioindicator potential of the native bivalve *D. expansus* through the use of gills histopathology in order to analyze the possible toxic effects of environmentally relevant concentrations of atrazine, commonly used in the crops of sugar cane and presents great contamination potential of water bodies. First, it was performed to characterize the histology and histochemistry of the gills and the establishment of the morphological pattern of the control group. After acute exposure to different concentrations of atrazine herbicide under controlled laboratory conditions, it was performed the histopathological analysis of the gills, including histochemical, ultramorphological and ultrastructural techniques. Morphological analyses of gill filaments of this species revealed the existence of a specialized support structure, the skeletal rod, not yet described in literature. Histopathological analyses revealed changes related to protection and damage of the cells and other structures that constitute the gill filaments, as well as evidence of greater energy expenditure, probably due to the activation of costly detoxification processes. These changes were more diverse and frequent in animals exposed to higher concentrations of the herbicide, revealing a dose-dependent response. Thus, this work points out the danger of indiscriminate use of this herbicide under an ecotoxicological point of view as it can cause morphological alterations that are adverse to the health and performance of representatives of the endemic malacofauna.

Keywords: mussel; pesticide; gills; histology; histochemistry; ultramorfology; ultrastruture.

3. INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas, a agricultura mundial cresceu em produtividade e área cultivada acompanhada pelo uso intenso de agrotóxicos, que também sofreram grandes evoluções. Muitas moléculas novas surgiram, com características físico-químicas que propiciam funcionalidades diferenciadas e comportamentos ambientais distintos, com grandes alterações nos perfis toxicológicos e ecotoxicológicos, fruto dos avanços tecnológicos e pressões ambientalistas (ARMAS et al., 2005).

Ainda que os benefícios do uso de agrotóxicos sejam claros, muitos questionamentos são feitos sobre a real necessidade de sua utilização, devido aos riscos que podem causar à saúde do consumidor e ao meio ambiente. A prática mundial do uso de agrotóxicos, muitas vezes indiscriminada e abusiva, vem trazendo preocupações às autoridades públicas e aos envolvidos com saúde e sustentabilidade de recursos naturais, em consequência da contaminação ambiental (UETA et al., 1998).

Embora a agricultura seja apenas uma das inúmeras fontes não pontuais de poluição de corpos hídricos, geralmente é apontada como a maior contribuinte de todas as categorias de poluentes (EDWIN, 1996). Os químicos utilizados na agricultura podem chegar aos rios carregados pelas chuvas, por despejos industriais e urbanos e por assoreamento do solo (YAMAGISHI et al., 1981; OHYAMA et al., 1986). Além disso, os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos por aplicações intencionais ou por deriva e escoamento superficial, a partir de áreas que sofreram aplicações diretas desses produtos (EDWARDS, 1973).

O Brasil apresenta um dos maiores mercados na área de proteção de plantas, sendo a agricultura praticada em nosso país ainda altamente dependente de insumos químicos, dentre os quais se destacam os agrotóxicos. Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDAG, o mercado de defensivos agrícolas no Brasil movimentou cerca de US\$ 6,6 bilhões (R\$ 12,9 bilhões), sendo o estado de São Paulo um dos líderes em consumo, representando 15% do valor comercializado no país em 2009 (SINDAG, 2009).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas constituem o grupo mais empregado na agricultura (aproximadamente 65%). Esses químicos têm como função controlar plantas daninhas, um dos fatores redutores de produtividade, sem injuriar as culturas agrícolas. Estima-se que as perdas ocasionadas nas culturas agrícolas, pela interferência das plantas daninhas, no Brasil, estejam em torno de 20-30% (LORENZI, 1990).

Dentre as culturas agrícolas presentes no estado de São Paulo, ocorre o destaque da cana-de-açúcar que representa 25% do uso do solo rural do estado e 58% da produção nacional de cana-de-açúcar (BRASIL, 2009). A cultura da cana-de-açúcar respondeu, em 2009, por 8% das vendas de agrotóxicos no Brasil, atrás somente da soja e do milho (SINDAG, 2009).

O cultivo de cana-de-açúcar abrange quase a totalidade do território estadual, sendo a região de Piracicaba (SP) considerada, por muitos anos, a maior produtora. No ano de 2006, dos 40 Escritórios de Desenvolvimento Rural (EDRs) que compõem o estado, os de Piracicaba e Limeira ocuparam o 10º e 11º lugar em produção de cana-de-açúcar, respectivamente (SÃO PAULO, 2007).

Grande parte da região de Limeira (SP) e parte da região de Piracicaba (SP) são abrangidas pela sub-bacia hidrográfica do rio Corumbataí, integrante da bacia hidrográfica do rio Piracicaba, onde o cultivo de cana-de-açúcar é a principal atividade agrícola. Além disso, o rio que atravessa esta bacia e que lhe empresta o nome é responsável pelo abastecimento de vários municípios (ARMAS et al., 2005).

Armas et al. (2005) avaliaram o consumo total de agrotóxicos na sub-bacia do rio Corumbataí no período de quatro anos (2000-2003) e concluíram que os herbicidas representam a classe de agrotóxicos mais empregada na cultura da cana-de-açúcar. Dentre os herbicidas, a atrazina ocupou posição de destaque representando 14,53% dos produtos utilizados, perdendo somente para o glifosato com 19,88%.

A atrazina é um potencial contaminante de corpos hídricos e do solo devido as suas propriedades químicas como, grande potencial de lixiviação, alta persistência no solo e solubilidade moderada na água (EISLER, 1989). Parte deste herbicida é degradada no ambiente por processos químicos e microbiológicos (SKIPPER et al., 1967) e parte é lixiviada pela chuva e água de irrigação, atingindo águas superficiais (LUIZ et al., 2004)

Por meio de um estudo com os bivalves límnicos *Anodontites trapesialis* e *Corbicula fluminea*, o herbicida atrazina mostrou-se altamente acumulativo, sendo que sua concentração na massa visceral desses invertebrados alcançou níveis 30 vezes maiores que a água, onde se encontravam expostos por 48 horas (JACOMINI et al., 2006).

Na ostra *Crassostrea gigas*, a exposição à atrazina em maiores concentrações ambientais durante um curto período de exposição levou a mudanças moderadas na agregação de hemócitos (AUFFRET; OUBELLA, 1997). Moraga e Tanguy (2000) observaram uma taxa de mortalidade de aproximadamente 60-70% de espécimes adultos do mesmo animal, quando expostos a concentrações de 100 e 200 µg/L deste herbicida depois de dois meses de

experimento. O efeito negativo da exposição à atrazina no crescimento e desenvolvimento de *C. gigas* juvenis também já foi relatado na literatura (ROBERT et al., 1986 apud BOUILLY et al., 2004).

Segundo Jacomini et al. (2003), devido as suas propriedades físico-químicas, a atrazina tem se mostrado relativamente estável no meio ambiente, tornando-se prejudicial à biota. Os efeitos tóxicos deste herbicida em peixes e insetos aquáticos têm sido relatados por alguns pesquisadores (DEWEY, 1986; EISLER, 1989). Além disso, estudos da bioacumulação da atrazina em moluscos e peixes tem mostrado acumulação via brânquias e sangue no fígado, cérebro, intestino e gônadas (GUNKEL; STREIT, 1980; PREEZ; VUREN, 1992).

Neste sentido, diferentes grupos de organismos são utilizados como bioindicadores da avaliação de possíveis efeitos de contaminação natural ou de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, moluscos bivalves têm se destacado nas últimas décadas como bioindicadores de toxicidade de poluentes; muitos deles apresentam hábito sésil e filtrador, o que é altamente desejado em estudos de bioacumulação de poluentes orgânicos e metais (RITTSCHOF; McCLELLAN-GREEN, 2005).

Consequentemente, bivalves vem sendo amplamente utilizados em programas de monitoramento biológico tanto em ambiente marinho (FARRINGTON, 1983; DE GREGORI et al., 1994; MCCONNELL; HARREL, 1995) quanto em ambiente límico (MANLY; GEORGE, 1977; FOSTER; BATES, 1978; VILLAR et al., 1999). A maioria dos estudos utilizando bivalves como bioindicadores foram realizados em regiões temperadas como Europa e América do Norte, dando principal atenção às espécies locais como *Mytilus californianus*, *M. edulis* e *M. galloprovincialis* (GREGORY et al., 2002).

Por outro lado, existe um crescente interesse neste tipo de análise nos países tropicais e subtropicais, onde estas espécies não fazem parte da malacofauna local. Assim, uma série de outras espécies tem sido utilizada como, por exemplo, o bivalve estuarino *Mytella falcata* (DAVID; FONTANETTI, 2005; 2009; DAVID et al., 2008), o bivalve marinho *Perna perna* (FERREIRA et al., 2004) e bivalves de água doce como *Anodontites trapesialis* (TOMAZELLI et al., 2003; LOAYZA-MURO; ELIAS-LETTS, 2007).

Diplodon expansus (Kuster, 1856) é uma espécie nativa que vive em ambientes de água corrente, geralmente em rios que drenam para o Atlântico, nos estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, ou para o alto rio Paraná, como o rio Tietê. Conhecida popularmente como marisco de água doce, esta espécie também é encontrada na bacia hidrográfica do rio Piraquara, PR (MEYER et al., 2010), no reservatório de Guarapiranga, nas nascentes do Tietê

em São Paulo e em unidades de conservação como a Reserva Biológica (REBIO) da Serra do Mar, SP (MANSUR; SANTOS, 2008).

Como os demais moluscos bivalves de água doce, *D. expansus* é um filtrador ativo, desempenhando um papel de extrema importância no meio ambiente. Esses invertebrados controlam a quantidade de fitoplâncton, detritos e partículas inorgânicas, promovendo o aumento da penetração de luz para macrófitas submersas, das quais uma variedade de outros animais depende (VAUGHN; HAKENKAMP, 2001 apud MEYER et al., 2010). Além disso, integra a cadeia alimentar de vários vertebrados, entre os quais o homem. Pode ser utilizado como indicador de condições ambientais ou como biomonitor de alterações ambientais ou de poluição (MANSUR; SANTOS, 2008).

A espécie *D. expansus* foi estudada, até o momento, sob aspectos reprodutivos (CURIAL; LANGE, 1974a, b; 1975) e ecológicos como densidade e biomassa de algumas populações (HENRY; SIMÃO, 1984; 1985; HENRY; FILOSO, 1987). Recentemente, Meyer et al. (2010) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi analisar a distribuição de classes de tamanho e a proporção sexual em *D. expansus*, na Área de Proteção Ambiental do Piraquara, PR, a fim de contribuir com informações sobre os aspectos ecológicos e reprodutivos da espécie.

Apenas para *D. chilensis* e *D. fontineanus* foram desenvolvidos estudos ecotoxicológicos visando à avaliação da contaminação de corpos hídricos e sedimento por metais e herbicida (GUEVARA et al., 2004; 2005; JACOMINI et al.; 2011). Estudos voltados para a análise do potencial bioindicador da espécie *D. expansus* em ambientes límnicos impactados ainda não foram desenvolvidos.

A resposta biológica a agressões ambientais pode ser evidenciada em qualquer nível de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares ou reações intracelulares, passando por comunidades, populações, organismos, sistemas fisiológicos e células (WALKER et al., 1997). Entretanto, toda resposta biológica se manifesta primeiramente em nível bioquímico-celular (molecular) (DEPLEDGE, 1992), tornando as técnicas que evidenciam respostas em níveis mais baixos de organização biológica mais preventivas, ou seja, as alterações na estrutura e função dos ecossistemas passariam a ser evitadas (NASCIMENTO et al., 2008).

Neste sentido, uma das abordagens mais promissoras para a detecção preventiva de efeitos adversos é o uso de biomarcadores (NASCIMENTO et al., 2008). O uso mais comum do termo biomarcadores é para indicadores bioquímicos, fisiológicos ou histológicos de exposição a xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos, em níveis suborgânico ou

orgânico (HUGGETT et al., 1992). Desta forma, a fim de identificar os efeitos dos poluentes nos seres vivos, uma variedade de testes foi desenvolvida, sendo que cada um deles apresenta certa especificidade e pode analisar respostas diferentes nos diversos tecidos do organismo estudado.

A análise histopatológica tem sido utilizada com sucesso em estudos ecotoxicológicos, visto que fornece informações sobre a saúde geral dos animais e sobre modificações teciduais específicas para os diferentes contaminantes (SUNILA, 1987; FONTANETTI et al., 2010). A vantagem do uso da histopatologia como biomarcador está em sua localização intermediária no que diz respeito ao nível de organização biológica (BERNET, 1999); alterações histológicas aparecem como uma resposta de meio termo a estressores subletais.

Usualmente, bivalves adsorvem pesticidas através das brânquias e os distribuem via hemolinfa para cada órgão, sendo semelhante o mecanismo para peixes (UNO et al., 2001). Neste sentido, a estrutura das brânquias pode ser considerada adequada para análises histopatológicas, uma vez que é formada por um epitélio simples, composto por uma variedade de tipos celulares, onde facilmente se observa os efeitos de poluentes solúveis em água (SUNILA, 1988).

Considerando a ausência de estudos que investiguem o potencial bioindicador do bivalve nativo *D. expansus*, abundante numa região de grande influência de agrotóxicos relacionados ao cultivo da cana-de-açúcar, e a escassez de informações precisas sobre os mecanismos de ação e medidas de segurança para a aplicação dessas substâncias, o presente projeto visou analisar os possíveis efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente realistas do herbicida atrazina no animal estudado por meio da análise histopatológica de suas brânquias.

4. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos subletais de concentrações ambientalmente realistas do herbicida atrazina no bivalve límnico nativo *D. expansus*, por meio de análises morfológicas das brânquias.

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

1. Descrever a morfologia das brânquias de *D. expansus* e estabelecer o padrão morfológico dos animais do grupo controle;
2. Expor exemplares de *D. expansus* a diferentes concentrações do herbicida atrazina, por sete dias, a fim de analisar a resposta aguda desses animais;
3. Analisar a ultramorfologia das brânquias dos animais expostos, a fim de identificar possíveis alterações na sua superfície por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
4. Analisar histologicamente as brânquias dos animais expostos a fim de se verificar possíveis alterações morfológicas;
5. Realizar testes histoquímicos para a detecção de proteínas e carboidratos com o intuito de observar possíveis alterações na síntese de algum elemento, que posteriormente, poderão indicar alterações fisiológicas;
6. Analisar por meio da ultraestrutura, possíveis alterações nas células que compõe os tecidos das brânquias de *D. expansus* utilizando-se da microscopia eletrônica de transmissão (MET);
7. Contribuir com informações sobre os potenciais efeitos do herbicida atrazina sobre o meio ambiente e a malacofauna, além de fornecer subsídios que possam servir de alerta para possíveis efeitos sobre o homem.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Bivalves da família Hyriidae: características gerais e estudos realizados

Moluscos bivalves não possuem cabeça, apresentam um único pé anexo a massa visceral, dois pares de brânquias e os sexos separados, podendo ocorrer alguns casos de hermafroditismo. Cada animal possui duas valvas que envolvem o corpo, cuja composição inclui carbonato de cálcio (BOGAN, 2008).

A classe Bivalvia inclui moluscos marinhos ou de água doce como ostras, mexilhões, vieiras e teredos. O nome comum para bivalve é marisco, sendo correto chamar qualquer bivalve de marisco, mesmo que ele seja uma vieira ou uma ostra (RUPPERT et al., 2005).

Os bivalves límnicos desempenham o papel de filtradores em rios e lagos. Muitas espécies são usualmente encontradas em densas agregações e filtram grandes quantidades de algas, bactérias, partículas orgânicas, além de absorverem metais e grandes moléculas orgânicas (BOGAN, 2008). Em concordância, Vaughn et al. (2008) afirmam que embora moluscos bivalves tipicamente se alimentem de fitoplâncton, evidências recentes indicam que esses invertebrados também utilizam fontes alimentares alternativas como bactérias, zooplâncton, rotíferos e detritos, os quais variam consideravelmente em tamanho e qualidade.

Os bivalves límnicos são encontrados em três diferentes subclasses, separadas em cinco ordens e divididas entre 19 famílias dentro da classe Bivalvia (DEATON; GREENBERG, 1991). Segundo Bogan (2008), existem 19 famílias com 206 gêneros reconhecidos como bivalves de água doce e um número de espécies estimado em 1026, sendo que a maioria das famílias é representada por um a cinco gêneros.

Na América do Sul, as famílias Hyriidae, Mycetopodidae e Sphaeriidae representam a maioria da diversidade, entretanto, seus representantes ainda continuam pouco conhecidos e estudados, assim como grande parte da malacofauna da região neotropical (BOGAN, 2008). Por outro lado, a diversidade de bivalves límnicos na Australásia é dominada pela família Hyriidae, representada por oito gêneros e 28 espécies. Esses moluscos são encontrados na Austrália, Tasmânia, Nova Zelândia, Nova Guiné e Ilhas Solomão (SMITH, 1992 apud BOGAN, 2008).

A família Hyriidae é geralmente incluída na superfamília Unionoidea, embora estudos recentes sugiram sua atribuição à superfamília Etherioidea (GRAF, 2000; WALKER et al., 2001). A distribuição zoogeográfica dessa família reflete sua ocorrência gondwânica com representantes na Australásia e América do Sul (MCMICHAEL; HISCOCK, 1958 apud BYRNE, 1998). Baseado em análises de DNA, os gêneros da família Hyriidae da América do

Sul e Australásia formam grupos irmãos monofiléticos, cujas relações com outras famílias unioniformes continuam incertas (HOEH et al.1999; GRAF, 2000).

A biologia dos bivalves límnicos pertencentes à família Unionidae na América do Norte é mais compreendida devido ao amplo histórico de pesquisas quando comparada a família Hyriidae no hemisfério sul (BYRNE, 1998). Diferentes pesquisadores afirmam que pouco é conhecido sobre a ecologia populacional (WALKER et al., 2001) e aspectos ultraestruturais (COLVILLE; LIM, 2003) das espécies australianas pertencentes a família Hyriidae. Diante da falta de informações imprescindíveis para conservação desse grupo de bivalves límnicos, Brainwood et al. (2008) utilizaram a geomorfologia como ferramenta de avaliação dos fatores que determinam a distribuição de espécies de bivalves incluindo da família Hyriidae, no rio Hawkerbury-Nepean, Austrália. Esse trabalho foi o primeiro a relacionar a complexidade de habitat, quantitativamente com a densidade populacional e a distribuição de classe de tamanhos de bivalves límnicos.

Alguns aspectos reprodutivos e morfológicos de hyriídios australianos foram descritos em alguns estudos (JUPITER; BYRNE, 1997; BYRNE, 1998, 2000; COLVILLE; LIM, 2003). Byrne (1998) investigou a biologia reprodutiva de populações de *Hyridella depressa* presentes em lagos e rios australianos que apresentam diferentes localizações e níveis de influência antropogênica. Buscou-se compreender detalhes do ciclo gametogênico da espécie por meio da análise histológica das gônadas e a influência dessas variáveis na reprodução desses invertebrados.

Utilizando-se a microscopia de luz e eletrônica, os bivalves límnicos australianos *Velesunio ambiguus* e *H. depressa* tiveram a morfologia dos seus palpos e manto analisada por Colville e Lim (2003). Os resultados revelaram que os palpos e manto consistem em abas de tecido margeadas por epitélio simples nas superfícies externa e interna. O tecido interveniente consiste, principalmente, de tecido conjuntivo, musculatura, nervos e vasos de hemolinfa com hemócitos. Os pesquisadores observaram também que ambos os moluscos apresentam similaridades com os representantes das famílias Margaritiferidae e Unionidae, particularmente em relação à ocorrência de grânulos mineralizados extracelulares.

Os grânulos de *H. depressa* capturam uma variedade de elementos do ambiente e muitos estudos têm destacado sua aplicação no monitoramento da poluição por metais (VESK; BYRNE, 1999; BYRNE, 2000). Desta forma, Colville e Lim (2003) afirmaram que a literatura traz, principalmente, informações sobre a estrutura e composição desses grânulos extracelulares devido a sua capacidade de acumular metais.

Vesk e Byrne (1999) compararam duas metodologias a fim de apontar a mais adequada para preparação dos grânulos extracelulares do bivalve *H. depressa* em estudos ecotoxicológicos. A análise dos dados obtidos revelou a necessidade da criopreparação das amostras a fim de manter a distribuição e concentração dos elementos de interesse. Além disso, os pesquisadores concluíram que o uso dos grânulos no biomonitoramento pode ser particularmente promissor quando associado ao método de biópsia do manto, principalmente em populações de moluscos encontrados em baixa densidade populacional.

Byrne (2000) descreveu a distribuição e estrutura dos grânulos de *H. depressa* por meio da microscopia de luz e eletrônica. A caracterização dos elementos presentes nos grânulos foi realizada utilizando-se manto criopreservado submetido à microanálise por raios-X. A autora apontou possíveis funções desempenhadas pelos grânulos nesses invertebrados como homeostase de cálcio, biomineralização, detoxicação de elementos potencialmente danosos e depósito de cálcio para formação de conchas gloquídeas.

Os moluscos bivalves de água doce da superfamília Unionoidea apresentam uma larva chamada gloquídio que geralmente parasita os peixes (MANSUR, 1999). Os gloquídeos das espécies sul-americanas (Hyriidae) possuem afinidades morfológicas com as espécies australianas e são distintos das demais espécies de Unionoidea que vivem na região Holártica (BONETTO et al., 1986). Entre os Hyriidae são conhecidos fundamentalmente dois tipos de gloquídeos: os portadores de dentes, que apresentam desenvolvimento parasitário no peixe, onde se forma um cisto no qual o gloquídio completa seu desenvolvimento até pós-larva, e os que não possuem dentes e apresentam um desenvolvimento completo, dentro dos ovos que permanecem em bolsas incubadoras chamadas marsúpios, até a pós-larva (ORTMANN, 1921 apud MANSUR, 1999).

Diante do escasso conhecimento da morfologia e da fase parasitária de gloquídeos da América do Sul, Mansur (1999) realizou um trabalho com larvas da espécie *Diplodon martensi*, o qual contribuiu com informações morfológicas e sistemáticas desse grupo de bivalves de água doce.

Mansur e Anflor (1981) estudaram a morfologia interna de *D. charruanus* e *D. pilsbryi*, espécies que habitam ambientes límnicos diferentes, como substrato de areia grossa com água corrente e fundo lodoso com águas tranquilas, respectivamente. Esse estudo teve como principal objetivo estabelecer critérios diferenciais em nível de morfologia interna na identificação dessas espécies.

A anatomia funcional de *D. rotundus gratus* e os principais aspectos ecológicos da espécie foram descritos por Hebling e Penteado (1974). Exemplos foram coletados em

águas represadas do rio Tietê, nas proximidades da cidade de Barra Bonita, estado de São Paulo, Brasil.

A análise de proporção de sexos em *D. deodontus expansus* foi realizada por Curial e Lange (1974a), por meio de amostras coletadas em diferentes anos (1972, 1973 e 1974) e meses (janeiro, agosto, outubro, novembro e dezembro) no rio Cerne, município de Campina Grande do Sul, no estado do Paraná, Brasil. Não houve influência sazonal quanto a proporção de sexos, ocorrendo 47,1% de machos, 51,5% de fêmeas e 1,3% de hermafroditas para o total de 380 moluscos estudados.

Posteriormente, Curial e Lange (1974b) descreveram os casos de hermafroditismo encontrados. Os pesquisadores afirmaram que entre os Unionacea, os sexos são em geral separados e o hermafroditismo está limitado a poucos indivíduos. Nos exemplares analisados, os espermatozóides e os óvulos são produzidos em ácinos distintos e as gônadas são constituídas de ácinos ovarianos e testiculares localizados no tecido conjuntivo na massa visceral. Provavelmente, o termo ácino foi utilizado pelos autores devido à semelhança entre os ácinos glandulares e os folículos gametogênicos, os quais apresentam uma estrutura ramificada arborescente como descrito para *Anodontites trapesialis* (CALLIL; MANSUR, 2007).

Os aspectos relativos à morfologia e ao desenvolvimento das gônadas em indivíduos de *D. deodontus expansus* coletados em janeiro e julho de 1974 no Rio Cerne, Município de Campina Grande do Sul, Paraná, Brasil foram analisados por Curial e Lange (1975). No testículo do mesmo indivíduo, o aspecto histológico dos ácinos diferiu mesmo em ácinos contíguos. O epitélio contém uma camada simples de espermatogônias reconhecíveis pelos núcleos grandes. Entre as espermatogônias e o lúmen dos ácinos foi possível encontrar quantidades variáveis de espermátides. No mesmo ácino ocorrem zonas onde predominam um desses dois tipos celulares. Espermatozóides em quantidade variável se acumulavam no lúmen do ácino. No ovário, os ácinos continham ovócitos em diversos graus de maturação. Grandes ovócitos podiam ser numerosos e preencher praticamente todo o lúmen da maioria dos ácinos. Os pesquisadores observaram que a proliferação do epitélio seminífero e a ovogênese mostraram maior intensidade no lote coletado em julho de 1974.

Informações sobre algumas características reprodutivas de *D. expansus* foram obtidas por meio de exemplares coletados no rio Piraquara, Paraná, Brasil (MEYER et al., 2010). A análise histológica das gônadas possibilitou a determinação de uma razão sexual 1:1, não tendo sido identificado nenhum caso de hermafroditismo, caracterizando uma população

tipicamente dióica. Além disso, as análises qualitativas e quantitativas demonstram uma gametogênese contínua, com picos de liberação larval no verão.

A espécie mais comum de bivalve límnico no Chile, *D. chilensis*, pertence à família Hyriidae, cuja distribuição inclui ambientes lênticos e lóticos localizados em diversas bacias hidrográficas (PARADA; PEREDO, 2002). Segundo Guevara et al. (2004), *D. chilensis* também é considerado um dos membros mais comuns da fauna de invertebrados de água doce da Patagônia, Argentina. Devido ao seu hábito filtrador e longevidade, esses moluscos podem influenciar a abundância das comunidades fitoplancônicas, a qualidade da água e o ciclo de nutrientes (SOTO; MENA, 1999).

Na região da Patagônia, estudos envolvendo a biologia da espécie *D. chilensis* revelaram que esses moluscos vivem enterrados em bancos de areia, absorvendo partículas orgânicas presentes na água da interface do fundo através do sifão inalante. Na maioria dos lagos, eles podem ser encontrados em bancos de areia de 2 a 50 metros de profundidade em densidades populacionais consideráveis com pouco deslocamento vertical (BOTTINI, 1993). Devido a essas características, tal espécie foi utilizada, com sucesso, em diferentes estudos como um bioindicador de contaminação por metais em corpos d'água da Patagônia (GUEVARA et al., 2004, 2005).

A distribuição de metais em lagos do Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagônia, Argentina foi avaliada por meio do bivalve *D. chilensis*, coletado em quatro lagos diferentes. A glândula digestiva e os tecidos moles foram analisados separadamente, determinando-se a concentração de potenciais poluentes como Ag, As, Cr, Hg, Sb e Se e outros nove elementos de interesse (Ba, Br, Ca, Co, Cs, Fe, Na, Sr e Zn). Os pesquisadores observaram que alguns elementos traço, como Ar e Cr, são encontrados em maiores concentrações nos tecidos de moluscos coletados em lagos que sofrem maior interferência de atividades humanas (GUEVARA et al., 2004).

Posteriormente, Guevara et al. (2005) avaliaram o impacto causado pela Ag na biota de lagos também localizados no Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagônia, Argentina, os quais diferem no nível de influência humana. Para isso, os pesquisadores utilizaram a glândula digestiva e os tecidos moles do bivalve nativo *D. chilensis* e o fígado e musculatura de cinco espécies de peixes, sendo duas nativas e três exóticas. Os resultados revelaram que a Ag em moluscos encontrava-se estreitamente relacionada com o sedimento onde se enterram e a análise do fígado das diferentes espécies de peixes evidenciou a ocorrência da biomagnificação da prata na cadeia alimentar, sendo os predadores de topo os mais afetados.

No norte do Brasil, bivalves límnicos da família Hyriidae como *Paxydon syrmatophorus* são coletados no baixo Rio Tocantins por pescadores que vendem as conchas para fabricação de botões feitos com a camada nacarada de madre pérola. Devido ao interesse comercial, estudos sobre a biologia reprodutiva desses moluscos tornaram-se necessários, a fim de elaborar estratégias de manejo adequadas para exploração (BEASLEY et al., 2000). Beasley et al. (2000) realizaram análises mensais de cortes histológicos das gônadas e inspecionaram as demibrânquias de fêmeas entre setembro de 1997 e agosto de 1998, a fim de esclarecer aspectos fundamentais da biologia reprodutiva de uma população de *P. syrmatophorus*. Os resultados revelaram que a gametogênese ocorre durante todo ano, enquanto que a desova ocorre durante os meses da estação seca. Em termos de estratégias de manejo, os autores acreditam ser necessária a manutenção de uma proporção de indivíduos sexualmente maduros e de indivíduos pequenos com o intuito de permitir, respectivamente, a reprodução e o recrutamento na população.

5.2. A utilização de moluscos bivalves em estudos ecotoxicológicos

Muitas substâncias químicas potencialmente danosas de origem antropogênica são liberadas no ambiente aquático constantemente. Resíduos oriundos de atividades agrícolas e efluentes de origem industrial e doméstica são lançados em mares e rios, contribuindo para a contaminação dos ecossistemas aquáticos (ARIAS et al., 2006). Silva et al. (2003) alertaram que contaminantes ambientais como, por exemplo, metais e agroquímicos podem afetar os organismos de forma direta e induzir mutações, alterações morfológicas, distúrbios fisiológicos e problemas de desenvolvimento.

Neste sentido, diferentes grupos de organismos são utilizados como bioindicadores na avaliação dos possíveis efeitos da contaminação ambiental de origem antropogênica. Em ambientes aquáticos, moluscos, vermes, esponjas, anfíbios e peixes têm sido utilizados como biomonitores de toxicidade de poluentes de diferentes naturezas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os moluscos bivalves são ecologicamente e economicamente importantes no ecossistema aquático. Inúmeras características fazem desses invertebrados bioindicadores apropriados na avaliação e no monitoramento da poluição da água e do sedimento como ampla distribuição geográfica, fácil coleta, hábito sésil, tolerância a alterações ambientais e a contaminantes (ZHOU et al., 2008). Uma característica fisiológica de grande relevância é sua capacidade em filtrar grandes volumes de água (NAIMO, 1995), o que possibilita considerável bioacumulação de contaminantes ambientais como metais e agrotóxicos. Por

fazerem parte da alimentação de diversos seres vivos, incluindo o homem, são também utilizados em estudos de biomagnificação.

Na revisão realizada por Rittschof e McClellan-Green (2005), os autores apontaram os moluscos, especialmente gastrópodes e bivalves, como bioindicadores modelo da toxicologia ambiental e salientaram a importância em se desenvolver pesquisas multidisciplinares que trabalhem com diferentes níveis de organização biológica. Diante disso, moluscos bivalves marinhos, estuarinos e límnicos têm sido amplamente utilizados em estudos ecotoxicológicos, tanto em bioensaios sob condições laboratoriais controladas, quanto em campo empregando-se animais nativos e transplantados (RITTSCHOF; MCCLELLAN-GREEN, 2005; BOLOGNESI; HAYASHI, 2011). Esses invertebrados vêm sendo utilizados, até mesmo, em programas de biomonitoramento reconhecidos internacionalmente como o “Mussel Watch Program”, iniciado na década de 80 nos Estados Unidos da América (RITTSCHOF; MCCLELLAN-GREEN, 2005).

Vários parâmetros podem ser utilizados a fim de se avaliar os efeitos de contaminantes ambientais em bivalves, como moleculares, bioquímicos, genotóxicos, mutagênicos, morfológicos, fisiológicos e comportamentais. Neste sentido, uma grande variedade de ensaios pode ser empregada, possibilitando a análise de respostas de estresse ambiental em diferentes níveis da escala biológica.

Os principais órgãos dos bivalves utilizados em análises toxicológicas são as brânquias (TÜRKMEN, CIMINLI, 2007; DAVID et al., 2008a) e a glândula digestiva (MANTECCA et al., 2006; RIGONATO et al., 2005). Outras estruturas e órgãos que são utilizados, com menor frequência, em estudos ecotoxicológicos são as valvas (GUNDACKER, 2000; PROTASOWICKI ET AL., 2008), manto (GUNDACKER, 2000) e gônadas (MANTECCA et al., 2006). Além disso, células que ganham destaque na avaliação dos efeitos de agentes tóxicos são os hemócitos (PEREZ; FONTANETTI, 2011) e os mucócitos localizados nos filamentos branquiais dos bivalves (DAVID; FONTANETTI, 2009).

O ensaio do cometa é utilizado em avaliações do potencial genotóxico de amostras ambientais e xenobióticos isolados em diferentes organismos como peixes (SOUZA; FONTANETTI, no prelo; VENTURA et al., 2008), bivalves (DAVID et al., 2008b; FERNÁNDEZ-TAJES et al., 2011) e em culturas de células (MATSUMOTO et al., 2005). Diferentes células dos moluscos bivalves podem ser submetidas a esse ensaio como, por exemplo, os hemócitos e as células que compõem as brânquias e a glândula digestiva. Para o bivalve límnic *Corbicula fluminea*, Rigonato et al. (2005) verificaram que a glândula

digestiva e os hemócitos presentes na hemolinfa do animal são mais indicados para a realização do ensaio do cometa quando comparados com as brânquias. Resultados semelhantes foram observados por David et al. (2008b) para o bivalve estuarino *Mytella falcata*.

A avaliação do potencial mutagênico de xenobiontes em moluscos bivalves pode ser realizada por meio do teste do micronúcleo. As células utilizadas nesse teste são usualmente obtidas na hemolinfa (MANTECCA et al., 2006) ou nas brânquias (BARSIENTE et al., 2008) dos bivalves. Na revisão realizada por Bolognesi e Hayashi (2011), os autores discutiram a ampla validação do teste do micronúcleo em bivalves e enumeraram uma série de estudos de campo que utilizaram com sucesso esse teste em bivalves do gênero *Mytilus*.

Os níveis de atividade enzimática e a quantificação de proteínas relacionadas com processos de metabolismo e detoxificação de xenobióticos recebem especial atenção em estudos ecotoxicológicos que empregam parâmetros bioquímicos de avaliação (BOLDINACOSQUERIC et al., 2010). Na revisão de Sheehan e Power (1999), foram compiladas algumas das principais enzimas utilizadas em estudos de biomonitoramento ambiental com moluscos bivalves, destacando-se a glutatinox-S-transferase, metalotioneínas, catalase e citocromo P-450.

A utilização de parâmetros químicos na ecotoxicologia aquática é bastante comum. Alguns estudos são realizados em campo e buscam quantificar os níveis de xenobióticos em amostras de água, de sedimento e nos tecidos de organismos como moluscos bivalves e peixes (STORELLI; MARCOTRIGIANO, 2001; JACOMINI et al. 2011). Na literatura também são encontrados estudos realizados em laboratório sob condições controladas, os quais visam obter informações sobre o potencial de bioacumulação de metais (CHENEY et al., 2008), pesticidas (JACOMINI et al., 2003; 2006) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (BIRDSALL et al., 2001) em diferentes espécies e órgãos de moluscos bivalves. Os resultados obtidos geram informações sobre a bioviabilidade, o potencial de bioacumulação e biomagnificação de diferentes xenobióticos, principalmente metais e agrotóxicos (BOENING, 1997).

A histopatologia ocupa lugar de destaque nos estudos ecotoxicológicos, visto que alterações morfológicas podem levar a prejuízos na função dos órgãos analisados e, conseqüentemente, na saúde e sobrevivência do organismo (SUNILA, 1987; FONTANETTI et al., 2010). As alterações morfológicas nos tecidos e células dos bivalves vêm sendo usualmente analisadas por meio da histologia de rotina (DAVID et al., 2008a; ZUPAN; KALAFATIC, 2003), microscopia eletrônica de varredura (DAVID; FONTANETTI, 2005;

GREGORY et al., 1999; NOGAROL et al., 2011) e de transmissão (BIGAS et al., 2001; GREGORY et al., 2002).

Em estuários, o gênero *Mytella* recebe especial atenção quanto ao seu uso como bioindicador devido à possibilidade de avaliação integrada da água e substratos. Desta forma, David e Fontanetti (2005) utilizaram a microscopia eletrônica de varredura para investigar a superfície dos filamentos branquiais de *M. falcata* e compará-los à estrutura das brânquias de espécimes coletados em locais que apresentavam diferentes níveis de influência de atividades antropogênicas no estuário de Santos, São Paulo, Brasil. Os resultados revelaram a ausência de alterações morfológicas, entretanto, nos animais coletados em um dos locais de grande influência de atividades poluidoras foi encontrado acúmulo de muco da superfície frontal dos filamentos. Os autores sugeriram que tais resultados refletem uma adaptação desses moluscos a exposição crônica a poluentes.

Dando continuidade ao estudo, David et al. (2008a) utilizaram as técnicas de histologia, histoquímica e ultraestrutura para analisar possíveis alterações nas brânquias de *M. falcata*. Os animais coletados nas regiões mais poluídas do estuário de Santos apresentaram alterações histopatológicas como: destacamento do epitélio na região intermediária, mudanças morfológicas do epitélio, processo inflamatório e aumento no número de células mucosas. Os autores sugeriram que tais alterações constituem uma tentativa de evitar a entrada de poluentes através dos filamentos branquiais para todo o organismo.

O estuário Thermaikos, localizado ao norte da Grécia, apresenta um conhecido gradiente de contaminação e também foi alvo de estudos de caráter ecotoxicológico. Domouhtsidou e Dimitriadis (2004) analisaram as alterações morfológicas dos palpos, brânquias e epitélio do intestino posterior de espécimes do bivalve marinho *Mytilus galloprovincialis* coletados em seis pontos ao longo do estuário. As alterações observadas incluíram destacamento das células epiteliais dos filamentos branquiais e espaços extracelulares dilatados nos palpos e intestino. Os autores ressaltaram que tais alterações encontram-se possivelmente relacionadas ao grau de poluição dos pontos analisados.

Na literatura é possível observar que uma das principais espécies utilizadas em estudos ecotoxicológicos em ambientes límnicos é o bivalve exótico *Corbicula fluminea* de origem asiática. Esses invertebrados foram utilizados principalmente na avaliação do potencial de bioacumulação e toxicidade de alguns metais essenciais e não essenciais (GRANEY JR et al. 1983; VILLAR et al., 1999;) e pesticidas (BASACK et al., 1998; JACOMINI et al., 2006) em laboratório e campo. Adam-Guillermin et al. (2009) empregaram essa espécie exótica num trabalho cujo objetivo foi avaliar a bioacumulação e os padrões de toxicidade do selênio, um

não-metal cujas concentrações essenciais e tóxicas possuem um estreito intervalo. Os autores utilizaram a histopatologia das brânquias como um dos parâmetros de avaliação da toxicidade do selênio orgânico. Por meio da microscopia eletrônica de transmissão, foi sugerido que as mitocôndrias são o primeiro alvo para citotoxicidade do selênio na forma orgânica como selenometionina (SeMet), a qual causou alterações morfológicas nas membranas externas e cristas mitocondriais.

Outra espécie exótica de bivalve límnic que se destaca em estudos ecotoxicológicos é *Dreissena polymorpha*, comumente chamado de mexilhão zebra. Mantecca et al. (2006) investigaram os efeitos histopatológicos nas gônadas, intestino e glândula digestiva desses moluscos expostos por sete e 14 dias a diferentes concentrações do herbicida paraquat, simultaneamente com a indução de micronúcleos nos hemócitos. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que o herbicida paraquat apresenta propriedades altamente citotóxicas e genotóxicas no bivalve estudado, sendo que os danos nas gônadas podem causar riscos ao sucesso reprodutivo da espécie.

5.3. Herbicida atrazina e seus efeitos sobre a biota aquática

A biota aquática está constantemente exposta a um grande número de substâncias tóxicas oriundas de diversas fontes de emissão. Os principais contaminantes de origem agrícola são os resíduos de fertilizantes e agrotóxicos. Esses produtos, quando aplicados sobre o campo de cultivo, podem atingir os corpos d'água diretamente, através da água da chuva e da irrigação, ou indiretamente através da percolação no solo, chegando aos lençóis freáticos (ARIAS et al., 2007).

Dentre os inúmeros agrotóxicos aplicados em áreas agrícolas, alguns herbicidas requerem grande atenção devido ao seu grande potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (ZUPAN; KALAFATIC, 2003; MANTECCA et al., 2006; JACOMINI et al., 2006). Os herbicidas triazínicos apresentam amplo potencial de contaminação de diferentes compartimentos ambientais em virtude de suas características tais como: alto potencial de escoamento e lixiviação e elevada persistência nos solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade baixa em água, adsorção moderada à matéria orgânica e à argila (EISLER, 1989).

A atrazina é uma substância que pertence ao grupo dos triazínicos cujas características físico-químicas e uso indiscriminado a tornou o maior contaminante das águas subterrâneas nos Estados Unidos. No Canadá, resíduos de atrazina são encontrados até mesmo em água de poços (GRISOLIA, 2005). Estudos mostraram que parte deste herbicida é degradada no

ambiente por processos químicos e microbiológicos (SKIPPER et al., 1967) e parte é lixiviada pela chuva e água de irrigação, atingindo águas superficiais (LUIZ et al., 2004). Devido ao seu alto grau de solubilidade na água e grande estabilidade, a atrazina pode manter-se no ambiente aquático por longos períodos e causar danos à biota (YANG et al., 2010).

Atrazina é o nome comum de 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina (fórmula química: $C_8H_{14}ClN_5$) estando entre os mais importantes herbicidas seletivos utilizados para pré e pós-emergência no controle de ervas daninhas. Esse herbicida é utilizado principalmente em culturas comerciais de cana-de-açúcar, sorgo e milho. É classificado como muito perigoso para o meio ambiente (classe III), altamente persistente e, possivelmente, carcinogênico para humanos.

Nas últimas décadas, os cultivos extensivos de soja e milho, que demandam grande uso de agrotóxicos, foram intensificados nos cerrados brasileiros. Diante disso, Laabs et al. (2000) realizaram um estudo para a verificação do potencial de lixiviação dos agrotóxicos mais comumente utilizados nessas culturas, como o herbicida atrazina em solos tropicais da região de Cuiabá, Estado do Mato Grosso, Brasil. Observou-se maior mobilidade dos herbicidas no subsolo quando comparados com os inseticidas, além disso, dentre os agrotóxicos testados, a atrazina apresentou um dos maiores padrões de mobilidade. Verificou-se também que o potencial de lixiviação desse herbicida em climas tropicais é maior que em climas temperados, em razão das chuvas torrenciais que ocorrem nos trópicos, aumentando a percolação que acarreta dissipação vertical dos agrotóxicos.

No trabalho realizado por Ward e Ballantine (1985), foram obtidas respostas agudas e crônicas de invertebrados como embriões de ostras, camarões e copépodos além do peixe *Cyprinodon variegatus* encontrados em estuários a fim de avaliar o potencial impacto da atrazina em ambientes aquáticos. Diante dos resultados obtidos, os autores afirmaram que a toxicidade da atrazina em organismos encontrados em estuários é muito similar a encontrada previamente em organismos límnicos. Por meio da determinação da DL50 dos diferentes organismos submetidos a diferentes concentrações de atrazina, os autores propõem uma concentração “segura” desse herbicida de 9 µg/L. Portanto, os autores acreditam que concentrações ambientais menores ou iguais a 2 µg/L de atrazina não devem causar efeitos adversos em invertebrados aquáticos e peixes. Em concordância com esses dados, a resolução CONAMA nº 357 (2005) estabelece a concentração máxima de atrazina de 2 µg/L em corpos de água doce.

Segundo Jacomini et al. (2006), os efeitos ecotoxicológicos desse herbicida em organismos aquáticos continuam pouco conhecidos. Desta forma, o potencial de bioacumulação desse herbicida em diferentes órgãos do bivalve límico *Anodontites trapesialis* foi investigado. Os resultados apontaram o manto mais sifão, massa visceral e o pé mais músculos, como principais órgãos de acúmulo de atrazina.

Zupan e Kalafatic (2003) realizaram um estudo dos efeitos de diferentes concentrações de atrazina (3, 50, 500 e 5000 µg/L) no bivalve límico *Dreissena polymorpha*, avaliando-se mortalidade e alterações morfológicas no hepatopâncreas, brânquias e gônadas. Foi constatado que os danos causados no hepatopâncreas e gônadas estão relacionados com a concentração e tempo de exposição dos animais ao herbicida. O hepatopâncreas e as gônadas sofreram maiores alterações histopatológicas quando os animais foram expostos por períodos mais longos a altas concentrações do químico, causando maiores taxas de mortalidade. Nas gônadas, a alteração mais evidente foi necrose do tecido conjuntivo. Os autores não encontraram alterações nas brânquias dos animais ao final do experimento. Entretanto, estudos com bivalves estuarinos (DAVID; FONTANETTI, 2005, 2009; DAVID et al., 2008a) e peixes (BIAGINI et al., 2009) confirmaram a sensibilidade deste órgão a muitos agentes potencialmente tóxicos encontrados no ambiente.

Mudanças comportamentais do bivalve límico *Elliptio complanata* foram avaliadas, expondo os animais a diferentes concentrações do herbicida atrazina por um curto período (FLYNN; SPELLMAN, 2009). Em condições normais simuladas pelo controle negativo, esses animais tenderam a se agregar. Entretanto, a exposição ao herbicida por 72 horas diminuiu a agregação dos animais. Como a agregação desses moluscos pode estar relacionada com sua reprodução, as pesquisadoras concluíram que até mesmo baixas concentrações do herbicida podem causar consequências ecológicas às populações dessa espécie.

O efeito imunotoxicológico de doses ambientalmente relevantes do herbicida atrazina (10, 23, 50, 100 µg/L) foi analisado no gastrópodo *Lymnaea stagnalis* (RUSSO; LAGADIC, 2004). Os resultados revelaram que todas as concentrações testadas induziram aumento significativo no número de hemócitos circulantes, sem nenhuma relação evidente entre concentração de exposição e resposta observada. Outro estudo revelou alterações histopatológicas no rim do gastrópodo *Physa acuta* exposto por 10 dias a atrazina na concentração 100 µg/L como a perda da integridade citoplasmática e posterior lise. Após o período de descontaminação ou recuperação, não foram evidenciados sinais de reversibilidade (ROSÉS et al., 1999).

Silvestre et al. (2002) afirmaram que a atrazina pode alterar a capacidade osmoregulatória de peixes e caranguejos, porém os mecanismos envolvidos ainda são pouco compreendidos. Desta forma, esses autores realizaram um trabalho cujo objetivo foi compreender o efeito do herbicida na osmoregulação do caranguejo *Eriocheir sinensis*, animal modelo em estudos fisiológicos, devido a sua capacidade de habitar tanto regiões de água doce como salina. Os pesquisadores concluíram que a homeostase do caranguejo não foi afetada a níveis consideráveis por esse poluente durante o período de duas semanas de exposição.

Estudos revelaram que peixes podem acumular o herbicida atrazina em seus tecidos como os do fígado, brânquias, sangue, cérebro ou músculo (GUNKEL; STREIT, 1980; PREEZ; VAN VUREN, 1992). Outros autores também confirmaram a capacidade desse herbicida em causar danos genotóxicos (VENTURA et al., 2008) e alterações endócrinas (MOORE; WARING, 1998), comportamentais (STEINBERG et al., 1995) e imunológicas (KREUTZ et al., 2010) em peixes.

Os estudos com anfíbios demonstraram claramente a fragilidade dos ecossistemas aquáticos às contaminações por agrotóxicos (GRISOLIA, 2005). O herbicida atrazina não é considerado altamente tóxico para rãs em concentrações ambientalmente relevantes (DIANA et al, 2000;. COADY et al, 2005), entretanto parece contribuir com o declínio populacional de anuros pois interfere no desenvolvimento gonadal normal desses animais (HAYES et al., 2002; 2003). Um dos casos mais conhecidos é o desenvolvimento de hermafroditismo e desmasculinação em sapos após exposição a baixas doses do herbicida atrazina (GILBERT, 2006; HAYES et al., 2002). Segundo Hayes et al (2002), esse herbicida parece induzir a ação da enzima aromatase, a qual é capaz de converter testosterona em estrógeno.

Diante dos possíveis efeitos desse herbicida sobre populações de anfíbios, Murphy et al. (2006) coletaram três espécies de anuros de locais com e sem prática agrícola no estado de Michigan, Estados Unidos. O objetivo desse estudo foi determinar a incidência de ovócitos testiculares e hermafroditismo nesses animais e avaliar possíveis correlações entre as concentrações obtidas de atrazina na água e tais alterações. Hermafroditismo foi utilizado em casos de indivíduos que possuíam tecidos gonadais femininos e masculinos em um ou ambas as gônadas, enquanto que o termo ovócitos testiculares foi utilizado para descrever casos em que um ou mais ovócitos ocorrem em testículos de sapos machos.

Foram realizadas coletas de animais jovens e adultos nos verões de 2002 e 2003. Nesse período as concentrações de atrazina obtidas não ultrapassaram 2µg/L na maioria das regiões agrícolas. Poucos indivíduos hermafroditas foram encontrados tanto em locais com

quanto em locais sem prática agrícola. Por outro lado, ovócitos testiculares foram encontrados em sapos machos na maioria dos locais, sem diferença significativa entre regiões agrícolas e não agrícolas. Os autores concluíram que as concentrações de atrazina não se encontravam correlacionadas de forma significativa à incidência de hermafroditismo e ovócitos testiculares.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Coleta dos animais

Espécimes de *D. expansus* (peso médio $\pm$ DP = 14,15g $\pm$ 7,8; comprimento médio $\pm$ DP = 4,29cm $\pm$ 0,84) foram coletados em abril de 2010 no Ribeirão Claro, município de Rio Claro (S 22°24'33.1''; O 47°32'25.1''), São Paulo, Brasil. Amostras de água do local foram coletadas seguindo recomendações específicas (CETESB, 1987; COGERH, 2001) e imediatamente encaminhadas para quantificação de metais e agrotóxicos.

No laboratório, os animais foram aclimatados em aquários com capacidade de 30 litros com água de poço artesiano por três dias, temperatura $\pm$ 25° C, aeração constante e ciclo claro/escuro de 12 horas. Este procedimento foi adotado a fim de evitar a influência do estresse da coleta e do transporte dos animais.

6.2. Análise química da água

Após a coleta das amostras de água, os frascos foram acondicionados em caixas térmicas com gelo reciclável e encaminhados ao laboratório TASQA Serviços Analíticos Ltda. (Paulínia, São Paulo, Brasil), onde foram realizadas as análises químicas.

Os parâmetros orgânicos (atrazina, glifosato, 2,4-D) e inorgânicos (alumínio dissolvido, cádmio total, chumbo total, cobre dissolvido, ferro dissolvido, manganês total, níquel total, prata total, zinco total) estabelecidos na resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) foram utilizados a fim de se avaliar a qualidade das amostras de água.

A análise dos resíduos de atrazina e 2,4-D foi realizada aplicando-se o método EPA 8270D para determinação da concentração de compostos orgânicos semivoláteis e para o glifosato, o método EPA 547 foi aplicado.

Para a quantificação dos metais, as amostras de água foram submetidas ao método SM21 3120B, utilizado na quantificação de elementos por espectrofotometria de emissão atômica em plasma de argônio indutivamente acoplado, em extratos aquosos, e similar ao método de quantificação EPA 6010B, após digestão ácida em sistema fechado com aquecimento por microondas pelos métodos EPA 3015 para amostras líquidas e EPA 3052 para amostras sólidas.

As concentrações de metais e agrotóxicos obtidas nas análises químicas das amostras de água do local de coleta dos animais foram comparadas com os valores máximos apresentados para corpos de água doce presentes na resolução do Conselho Nacional do Meio

Ambiente (CONAMA, 2005). As águas doces do território brasileiro são classificadas, segundo a qualidade requerida para os seus usos preponderantes. Desta forma, neste trabalho foram utilizados os valores para as classes I e II, as quais podem ser utilizadas para consumo humano e proteção das comunidades aquáticas.

Os padrões de qualidade das águas determinados nesta resolução estabelecem limites individuais para cada substância em cada classe e determina as concentrações máximas permitidas. Concentrações acima do permitido representam comprometimento na qualidade da água, para seus usos preponderantes.

6.3. Montagem dos bioensaios

Seis aquários com capacidade de 10 litros foram utilizados: um aquário para o grupo controle, contendo somente água do poço artesiano e os outros cinco, com diferentes concentrações de atrazina (2, 6.25, 12.5, 25 e 50 µg/L) obtidas diluindo-se a solução estoque (0.5g/L) na água. A maior concentração utilizada (50 µg/L) consiste no dobro da solução indicada para uso agrícola e a menor (2 µg/L), a máxima concentração permitida em corpos de água doce pela legislação brasileira, conforme a resolução CONAMA nº 357 (2005). Foram utilizadas tais concentrações para se avaliar os efeitos da aplicação indiscriminada de agrotóxicos e o efeito da diluição desse herbicida nos corpos hídricos, aproximando-se de concentrações ambientalmente realistas. Os bioensaios foram denominados da seguinte forma:

Controle: 8L de água do poço artesiano

Tratamento 1: 8L de água do poço artesiano + 16 µg de atrazina (2 µg/L)

Tratamento 2: 8L de água do poço artesiano + 50 µg de atrazina (6,25 µg/L)

Tratamento 3: 8L de água do poço artesiano + 100 µg de atrazina (12,5 µg/L)

Tratamento 4: 8L de água do poço artesiano + 200 µg de atrazina (25 µg/L)

Tratamento 5: 8L de água do poço artesiano + 400 µg de atrazina (50 µg/L)

Os aquários permaneceram continuamente aerados por uma bomba de ar. Após o período de aclimação, os animais foram distribuídos randomicamente, sendo que em cada aquário foram expostos cinco animais por sete dias a fim de se obter a resposta aguda de exposição. Este tempo de exposição foi utilizado em trabalhos anteriores envolvendo atrazina e bivalves límnicos (ZUPAN; KALAFATIC, 2003; JACOMINI et al., 2006).

As condições experimentais consistiram em um sistema semi-estático em que 100% do volume d'água foi trocado a cada 24 horas, seguida da adição da solução estoque de

herbicida recém preparada em água destilada, com a intenção de manter a concentração das soluções-teste. A temperatura foi mantida entre 23 – 25°C durante o período de exposição.

Após sete dias de exposição, os moluscos foram anestesiados por choque térmico e tiveram pequenos fragmentos das mesmas regiões de suas brânquias retiradas e fixadas.

6.4. Histologia

6.4.1. Inclusão em resina (Historesina)

O material foi fixado em solução aquosa de Bouin por 24 horas; em seguida foi colocado em solução tampão fosfato de sódio pH=7 e mantido na geladeira. Posteriormente, o material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90 e 95%, durante 20 minutos cada banho. Na sequência, foi transferido para solução de resina Leica na ausência de catalisador, durante 24 horas em geladeira. Posteriormente, o material foi transferido para moldes plásticos previamente preenchidos com resina contendo catalisador.

Após a polimerização da historesina, os blocos foram seccionados com 5 µm, utilizando-se o micrótomo Leica RM 2245 com navalhas de vidro; os cortes foram hidratados em banho histológico e recolhidos em lâminas. Após secagem, os cortes foram corados com hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavadas em água corrente por 5 minutos para a reação; em seguida foram coradas com eosina aquosa por 5 minutos e lavadas em água. Após secagem, os cortes foram diafanizados em xilol e as lâminas montadas com bálsamo do Canadá. Posteriormente, as secções foram analisadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica.

6.5. Histoquímica

O material foi fixado e processado de acordo com os procedimentos da rotina histológica descritos previamente. Posteriormente, os testes histoquímicos foram aplicados nas secções histológicas a fim de se detectar a presença de diferentes compostos.

6.5.1. Técnica do azul de bromofenol para detecção de proteínas totais (PEARSE, 1985)

Os cortes, recolhidos em lâminas de vidro, foram corados com solução de azul de bromofenol à temperatura ambiente durante 1 hora, sendo em seguida lavados em solução aquosa de ácido acético 0.5%, durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram secos, diafanizados em xilol e as lâminas montadas em bálsamo do Canadá. Posteriormente, foram examinadas e fotografadas em fotomicroscópio Leica.

6.5.2. Técnica simultânea do PAS/azul de Alcian para detecção de polissacarídeos neutros e ácidos (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As secções histológicas foram coradas com azul de Alcian 1% pH 2,5 durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas contendo as secções foram lavadas em água destilada e passadas em ácido periódico 1% durante 5 minutos. Posteriormente, foram submetidas ao reativo de Schiff no escuro por 30 minutos e, em seguida, lavadas em água corrente durante 10 minutos. Na sequência, foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá, para posterior observação e registro em fotomicroscópio Leica. Foi realizada também a contagem de hemócitos infiltrados no epitélio e mucócitos presentes em 50 filamentos branquiais de cada indivíduo analisado. Esses dados foram submetidos à análise estatística.

6.5.3. Método de von Kossa para detecção de cálcio (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As secções foram imersas em nitrato de prata por 20 minutos, lavadas em água corrente e transferidas para revelador D-72 por 2 horas, imersas em fixador F-5 por 30 minutos e posteriormente lavadas em água corrente. As lâminas foram secas, diafanizadas em xilol e montadas em bálsamo do Canadá.

6.5.4. Técnica do picrocírius para detecção de colágeno total (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983, adaptado)

Os cortes foram colocados previamente por 15 minutos na estufa a 60° C. Posteriormente, os cortes foram submetidos à solução picrosírius a 60° C por 60 minutos numa estufa a 60° C. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada em três banhos. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá, secas em estufa e levadas ao fotomicroscópio Leica para análise.

6.5.5. Técnica do tricômico de Mallory para detecção de colágeno total (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As secções histológicas foram submetidas ao lugol por 4 minutos. Posteriormente, foram transferidas para solução de hipossulfito aquoso 5% e ali mantidas por 3 minutos. Na sequência, os cortes foram lavados em água corrente por 20 minutos e, em seguida, corados com hematoxilina de Harris por 10 minutos e lavados em água corrente por 5 minutos para a reação. As lâminas, contendo as secções histológicas, foram colocadas em câmara úmida e submetidas ao corante de Mallory por 15 minutos a 37°C. Em seguida, os cortes foram

lavados em água destilada em três banhos. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá, secas em estufa e levadas ao fotomicroscópio Leica para análise.

6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Fragmentos das brânquias foram fixados em solução Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) por 2 horas e desidratadas em uma série de concentrações crescentes de acetona. Posteriormente, o material foi levado ao ponto crítico (Balzer CPD 030), fixado em suportes metálicos e coberto com ouro utilizando-se Sputtering Balzer SCD 050. O material foi analisado e fotografado no microscópio eletrônico de varredura Philips, operado em 12 Kv.

6.7. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Pequenos fragmentos de brânquias foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M a 4°C, lavados em tampão cacodilato de sódio e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas. O material foi novamente lavado no mesmo tampão, colocado em álcool 10% por 15 minutos e contrastado com acetato de uranila 2% em álcool 10% por 3 horas. Em seguida, foi desidratado em série crescente de acetona, submetido à solução resina: acetona (1:1) por 12 horas, embebido em resina Epon-araldite contendo catalisador por 24 horas e levado a estufa a 70°C por 24 horas para polimerização da resina. O material foi seccionado em ultramicrotomo Sorvall–Porter Blum e as secções ultrafinas foram coletadas em grades de cobre e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo durante 45 e 10 minutos, respectivamente. O material presente nas grades de cobre foi observado e fotografado ao microscópio eletrônico de transmissão Phillips CM 100, operado a 80 kV.

6.8. Análise estatística

O número de hemócitos infiltrados no epitélio e mucócitos foram contabilizados em 50 filamentos branquiais por indivíduo (cinco indivíduos para cada bioensaio). Durante a contagem dos mucócitos, foram diferenciadas as células íntegras das rompidas.

Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando-se o software SYSTAT 11 e o teste análise de variância (ANOVA). Os dados foram previamente analisados para verificar normalidade utilizando-se o teste a priori Shapiro-Wilk (SW), sendo considerados dados com distribuição normal aqueles que apresentaram $p > 0.05$.

7. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente trabalho são apresentados na forma de capítulos, sendo que cada um contém um artigo publicado ou submetido em periódico internacional e especializado. Os artigos seguem a formatação estipulada pelas revistas a que foram submetidos.

CAPÍTULO 1

Título do artigo: Morphological and histochemical characterization of gill filaments of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus* (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae).

Autores: Larissa Rosa Nogarol, Ana Luíza Brossi-Garcia, José Augusto de Oliveira David e Carmem Silvia Fontanetti.

Submetido ao periódico Tissue and Cell (2011).

CAPÍTULO 2

Título do artigo: Surface morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide.

Autores: Larissa Rosa Nogarol, Ana Luíza Brossi-Garcia e Carmem Silvia Fontanetti.

Publicado no periódico Microscopy Research and Technique, 2011.

DOI 10.1002/jemt.21130

CAPÍTULO 3

Título do artigo: Histopathology of the gill filaments of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus* after exposure to the herbicide atrazine.

Autores: Larissa Rosa Nogarol, Ana Luíza Brossi-Garcia e Carmem Silvia Fontanetti.

Submetido ao periódico Ecotoxicology and Environmental Safety (2012).

7.1. CAPÍTULO 1

Morphological and histochemical characterization of gill filaments of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus* (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae)

Larissa Rosa Nogarol¹; Ana Luiza Brossi-Garcia¹; José Augusto de Oliveira David² & Carmem Silvia Fontanetti^{1*}

¹ UNESP, São Paulo State University, Av. 24A, nº 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

² UFES, Federal University of Espírito Santo, Alto Universitário, s/nº, CEP 29500-000, Alegre, ES, Brazil.

Diplodon expansus gill filaments: morphology and histochemistry

* Corresponding author

E-mail address: fontanet@rc.unesp.br

Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

Artigo submetido ao periódico Tissue and Cell.

Resumo

O presente trabalho traz a descrição morfológica e a caracterização histoquímica dos filamentos branquiais do molusco bivalve endêmico brasileiro *D. expansus*, visando ampliar o conhecimento morfológico desta espécie e estabelecer a estrutura das brânquias que servirão como controle em estudos histopatológicos aplicados ao biomonitoramento. Os filamentos branquiais são divididos em três zonas: frontal, intermediária e abfrontal. Ocorrem pontes de tecido que interconectam os filamentos branquiais (junções interfilamentares) e as lamelas (junções interlamelares). No centro do filamento, hemócitos circulam pelo vaso de hemolinfa o qual é internamente revestido por endotélio. A superfície frontal dos filamentos é coberta por cílios, a superfície lateral exhibe dutos aquíferos e a superfície abfrontal apresenta células ciliadas e não ciliadas. O epitélio dos filamentos é constituído por células ciliadas, não ciliadas absorptivas e mucócitos. A sustentação dos filamentos é feita pela haste e alça de sustentação. Com base nas informações obtidas, os filamentos branquiais da espécie estudada apresentam algumas características peculiares ainda não relatadas detalhadamente na literatura como a presença simultânea da alça e haste de sustentação. Por outro lado, a constituição geral do filamento é semelhante àquelas descritas tanto para bivalves marinhos como límnicos e parecem ser adequadas para aplicação em estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chave: molusco; ctenidia; microscopia eletrônica de varredura; histologia.

Abstract

The present study presents the morphological description and histochemical characterization of gill filaments of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus*, aiming to broaden the morphological knowledge of this species and establish the structure of the gills that will serve as control in histopathological studies applied to biomonitoring. The gill filaments are divided into three zones: frontal, intermediate and abfrontal. In the center of the filament, haemocytes circulate through the haemolymph vessel, which is internally lined by endothelium. The frontal surface of the filament is covered with cilia, the lateral surface exhibits aquifer ducts and the abfrontal surface presents ciliated and non-ciliated cells. The epithelium of the filaments is constituted by ciliated cells, non-ciliated absorptive cells and mucocytes. The support of the filaments is made by two specialized structures called skeletal rod and skeletal loop. Based on the obtained information, the gill filaments of the studied species present some peculiar characteristics that are not yet reported in detail in the literature such as the simultaneous presence of skeletal rod and skeletal loop. On the other hand, the general constitution of the filament is similar to those described for both marine and limnic bivalves and seems to be suitable for ecotoxicological studies.

Keywords: mussel; ctenidia; scanning electron microscopy; histology.

1. Introduction

The interest in studying bivalve molluscs has increased considerably due to their population decline in several regions of the world and also due to their potential use as bioindicators in different impacted ecosystems (Colville and Lim, 2003).

The data available in the literature reveal the ability of these molluscs in accumulating pollutants of several chemical natures in their tissues (Alyakrinskaya, 2003), which can lead to the development of histopathologies as observed by Gregory et al. (2002) for the marine bivalve *Perna perna* exposed to mercury. Thus, the morphology of target organs such as gills of estuarine, marine and limnic bivalves has been studied in order to be used as indicators of environmental pollution, especially in regions under the influence of different pollutant sources (David and Fontanetti, 2005; David et al., 2008; Gregory and George, 2000; Gregory et al., 1996; Lemaire-Gony and Boudou, 1997).

However, most part of the ecotoxicological studies in freshwater bodies use exotic species such as *Corbicula fluminea* (Peltier et al., 2008; Villar et al., 1999), *Dreissena polymorpha* (Mantecca et al., 2006; Zupan and Kalafatic, 2003) and *Limnoperna fortunei* (Vilela et al., 2006), which preclude the performance of more accurate toxicological assessments under an ecological point of view. Besides, the responses of native Brazilian malacofauna exposed to potential toxic substances commonly found in freshwater bodies are little known.

The limnic malacofauna in Brazil has about 155 species of bivalve molluscs, which belongs mainly to four families: Hyriidae, Mycetopodidae, Sphaeridae and Corbiculidae. The first two have a wide geographical distribution, occurring in very varied habitats, such as lakes, marginal lagoons and reservoirs in most of the hydrographic basins of the South American continent, while the others are of a more restricted occurrence (Avelar, 1999).

The Brazilian endemic species *D. expansus* (Küster, 1856), popularly known as freshwater mussel, belongs to the Hyriidae family (Mansur and Santos, 2008), whose distribution is restricted to South America and Australia (Avelar and Cunha, 2009). Individuals of this species generally occur in rivers that drain into the Atlantic, in the states of São Paulo and Rio de Janeiro, or into the upper Paraná River, as the Tietê River (Mansur and Santos, 2008). The species *D. expansus* has been studied, so far, on reproductive (Curial and Lange, 1974 a,b; 1975) and ecological aspects, such as density and biomass of some populations and their role in the decomposition process in some ecosystems (Henry and Simão, 1984; Henry and Filoso, 1985; 1987).

In order to contribute to morphological information of the Brazilian species *D. expansus*, for conservation purposes and for its use as model in ecotoxicological studies in impacted limnic environments, this study aimed to characterize its gills, organs that are in direct contact with environmental contaminants such as metals and agrochemical residues.

2. Material and methods

2.1. Collection and acclimation

Specimens of *D. expansus* (average weight $\pm$ SD = 13.42g $\pm$ 6.64; mean length $\pm$ SD = 4.28cm $\pm$ 0.81) were collected in April 2010 in Ribeirão Claro stream, municipality of Rio Claro (S 22°24'33.1''; O 47°32'25.1''), São Paulo, Brazil. A collection site that does not suffer direct influence of industrial and agriculture practices was chosen and, therefore, can be considered a little impacted region.

In the laboratory, the animals were acclimated for three days in aquariums with capacity of 30 litres containing artesian well water, temperature $\pm$ 25° C, constant aeration and light/dark cycle of 12 hours. This procedure was adopted in order to minimize the influence of the stress of collection and transport of the animals.

The freshwater bivalve molluscs of the Hyriidae family, in which the species *D. expansus* belongs to, present larvae called glochidium that remain sheltered in the demibranch until they reach the maturity (Mansur, 1999). In this study, only animals that did not present marsupial gills sheltering larvae were used.

After acclimation, the molluscs were anesthetized by heat shock and small fragments of their gills were removed and fixed in different solutions.

2.2. Histology and histochemistry

The gill fragments were fixed in aqueous Bouin solution for 24 hours and then submitted to phosphate buffer solution 0.1M pH 7.4. In order to remove picric acid residues, the material was washed three times with the same buffer solution and then dehydrated in ethanol 70, 80, 90 and 95%, during 20 minutes each bath and embedded in resin for 24 h at 4°C. Subsequently, the material was transferred to plastic molds containing Leica resin for inclusion. After resin polymerization, the blocks were sectioned with 5 μ m thick, using Leica RM2245 microtome with glass knives; the sections were hydrated in histological bath and collected on microscope slides.

For the histological analysis, the sections were stained with Harris haematoxylin for 10 minutes and washed in running water for 5 minutes for the reaction; then they were stained with aqueous eosin for 5 minutes and washed in water. After drying, the slides were mounted in Canada balsam.

The histochemical tests were applied in order to detect the presence of the following compounds: total proteins – bromophenol blue (Pearse, 1985), polysaccharides – simultaneous technique with PAS and Alcian blue (Junqueira and Junqueira, 1983), calcium – von Kossa (Junqueira and Junqueira, 1983) and collagen – Mallory trichromic (Junqueira and Junqueira, 1983) and picosirius (Junqueira and Junqueira, 1983). This last technique was performed with some modifications described as follows: the sections were previously placed in incubator for 15 minutes at 60° C. Subsequently, the sections were submitted to the picosirius solution at 60° C for 60 minutes and then washed in distilled water in three baths. The slides were mounted with Canada balsam, dried in incubator and observed under light microscope. The photographic records and the measurements of the structures of the gill filaments were obtained using Leica photomicroscope and QWin Leica software.

2.3. Ultramorphology

Fragments of the gills were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965) for two hours and dehydrated in a series of increasing concentrations of acetone. Subsequently, the material was taken to the critical point (Balzer CPD 030), fixed in a metal holder and covered with gold using Sputtering Balzer SCD 050. The material was analyzed and photographed using a Philips scanning electron microscope, operated at 12 kV.

3. Results

Gills of *D. expansus* present an ample surface and are easily observed in the mantle cavity. In each animal there are two gills or ctenidia, one located on the right of the visceral mass and the other on the left (Fig. 1A). Each gill is formed by two demibranchs, the outer and the inner, arranged in a V shape. Each demibranch is constituted by two lamellae, which consist of parallel ciliated filaments (Fig. 1B). In the studied species, the gill filaments of the inner and outer demibranchs present similar morphology.

The frontal surface of the gill filament is completely covered by cilia (Fig. 2A and B), called frontal, latero-frontal and lateral cilia (Fig. 2C). The frontal cilia have an approximately length of 4 µm and are partially covered by latero-frontal cilia. Arranged on each side of the

filament, right below the frontal cilia, the latero-frontal cilia are longer (15 μm) and visually thicker since they are formed by clusters of cilia adhered to each other on their basal region (Fig. 2B). The lateral cilia are slightly longer (20 μm) and numerous.

The lateral surface does not have cilia; it is possible to observe there aquifer ducts (arrows in Fig. 2C and D), which occur at regular intervals. Ciliated cells and non-ciliated cells are found on the abfrontal surface of the gill filaments (Fig. 2F). Mucus spheres were also observed (Fig. 2E).

Between the two lamellae that compose the demibranch it is possible to observe the interlamellar space that contains the interlamellar junctions (Fig. 3A) and haemolymph vessels lined internally by endothelium, where the haemocytes pass through (Figs 3D and 4D).

The filaments are united to each other by interfilamentar junctions present preferentially in the regions where the interlamellar junctions occur (Fig. 3A) and where two or more filaments share the same haemolymph vessel (Fig. 3C). The communication between the external environment and the interlamellar space is done by occasional pores called ostia (* in Fig. 3B), located between the filaments that compose the lamella.

Each filament is divided into three zones: frontal, intermediate and abfrontal (Figs 1C and 3B). In the frontal zone, ciliated and non-ciliated epithelial cells are present, which exhibit different morphologies depending on their position in the gill filament (Fig. 3D). The apical region of the frontal zone is composed by columnar cells with preferably ovoid nuclei and short cilia, called frontal cells. Adjacent to these cells, there are large latero-frontal cells that have ovoid nucleus and cilia. Below these cells, where the narrowing of the gill filament occurs, non-ciliated cells, called absorptive postlateral-frontal cells, were observed. Next, cuboidal cells with round nucleus and long cilia were observed and named lateral cells (Fig. 3D).

The intermediate zone is composed by non-ciliated absorptive cells, whose nuclei are flattened, gradually approaching the morphology of squamous cells toward the abfrontal zone (Fig. 3D). Eventual mucocytes, rich in acid polysaccharides (Fig. 4E), were also observed in this zone.

The abfrontal zone is constituted by a simple layer of different epithelial cell types that join to each other delimiting the haemolymph vessel in the interlamellar space (Fig. 3E and F). The cells that compose this zone are: ciliated cells, non-ciliated absorptive cells and

mucocytes, which are supported by a thick basal membrane rich in neutral polysaccharides (Fig. 4F). Mucocytes occur in higher or lower number depending on the gill filament.

Beneath the epithelium, in the intermediate zone, highly basophilic paired structures are found, one on each side of the filament (Fig. 3D), called skeletal rods. These structures are rich in collagen (Fig. 4A and B), calcium (Fig. 4C) and neutral polysaccharides (Fig. 4E); however they do not present protein constitution (Fig. 4D).

The structure of the gills and the haemolymph vessel located in the central region of each filament are also supported by the skeletal loop (Fig. 3D). This support structure is found more internally in relation to the skeletal rod in the intermediate zone and adjacent to the epithelium in the frontal zone of the filament (Fig. 3D). The skeletal loop presents little presence of proteins (Fig. 4D), neutral polysaccharides (Fig. 4E) and collagen, the latter being only detected by the picosirius technique (Fig. 4B). The results of the histochemical tests are summarized in table 1.

4. Discussion

The present study is the first to use histochemical and ultramorphological techniques to analyze the gill filaments of a species of the genus *Diplodon*. Previously, gill filaments of *D. rotundus gratus* were analyzed at light microscopy level, in a study about the functional anatomy of the species (Hebling and Penteado, 1974). However, these authors only illustrated the general morphology of the filaments, without detailing the structure of their cells. Avelar and Cunha (2009) studied the anatomy and functional morphology of *D. rhombeus fontainianus*. The authors detailed the beating dynamics of the cilia present in the different regions of the gill filaments and discussed their function; however, they did not bring information about the morphology of the epithelial cells that compose the filament.

The mollusc bivalve *D. expansus* can be considered an eulamellibranch, since there are permanent and developed connections of tissue in the gills, called interfilamentar and interlamellar junctions. These structures arise as a response to the need for structural support of the filaments, in order to maintain the proper and constant space for filtration and avoid the passage of larger particles of food between adjacent filaments.

In addition to the connections of tissue, it was observed two specialized structures that help in the structural support of the gill filaments: skeletal rod and skeletal loop. The skeletal rod is a structure constituted by fibrous elements rich in collagen associated with neutral polysaccharides and calcium, which confers to the intermediate zone of the gill filament

higher resistance and rigidity. Hebling and Penteado (1974) illustrated the presence of this structure in the gill filaments of *D. rotundus gratus*. For the bivalve *Anodonta woodiana lauta*, it was observed the presence of a pair of small chitinous rods, arranged in parallel within each gill filament (Nakao, 1975). However, until now, it was not described in details the morphology, constitution and occurrence of this structure.

In the bivalve *D. expansus*, each gill filament exhibits internally a skeletal loop, present in the frontal and intermediate zones. This structure is composed by smaller amounts of collagen and neutral polysaccharides when compared to the skeletal rod. The skeletal loop seems to help the skeletal rod in the function of maintaining the structure of the filament, especially in the frontal zone where it is in direct contact with the epithelium.

The structure of the gill filaments of the limnic bivalve *Corbicula fluminea* is supported by a fibre rod that underlines the epithelium and resembles the skeletal loop of *D. expansus*, described in this study. This fibre rod presents itself thick in the ciliated region and very thin in the respiratory region (Lemaire-Gony and Boudou, 1997). For the estuarine bivalve *Mytella falcata*, this structure was called connective tissue due to its composition that includes collagen and neutral polysaccharides (David et al., 2008). On the other hand, this structure on the marine bivalve *Perna perna* presented chitinous constitution (Gregory et al., 2002).

In the present study, the specialized structures of support, skeletal rod and skeletal loop, occur simultaneously giving to the gill filaments great stability in structural terms.

Respiration is the main function attributed to the gills of bivalve molluscs. According to Gómez-Mendikute et al. (2005), gills present two elements to perform the respiratory function: a peripheral ciliated pump that generates a water flow rich in oxygen, over and through the demibranchs, and an internal circulatory system that carries the haemolymph rich in oxygen to the heart.

In the limnic bivalve *C. fluminea*, the abfrontal area of the gill filament performs the respiratory function (Lemaire-Gony and Boudou, 1997). On the other hand, Gómez-Mendikute et al. (2005) affirm that, for the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*, the flattened cells present in the intermediate zone of the filament is the place where the gas exchanges and the interaction between the external environment and the haemolymph occur. In *D. expansus*, this interaction would be impaired due to the presence of the rigid and thick skeleton rod between the epithelium and the haemolymph vessel. In this sense, the aquifer

ducts, located on the sides of the filament, possibly occur to enhance the contact of circulating water and the haemolymph, facilitating oxygenation.

The gills of bivalves that feed on suspended particles, such as *D. expansus*, are morphologically complex and also play the role to capture and process particles present in the water column (Dufour and Beninger, 2001). The food is filtered and separated by the ciliated epithelium and sent to the oral lobes. Later, by the action of the ciliary activity, the food particles reach the mouth opening of the animal (Alyakrinskaya, 2003). The rejected particles are swept to the edge of the lamella and directed towards the tips, which touch the mantle. Subsequently, the particles are transferred to the surface of the mantle and discarded into environment (Nakao, 1975). Silverman et al. (2000) concluded that the mechanism of processing food particles can be divided into different stages such as contact, capture, transport, selection and finally ingestion.

Thus, the presence of cilia in the gill filaments and their ordered activity are fundamental to the properly functioning of the feeding of these molluscs. As described for *D. rotundus gratus* (Hebling and Penteado, 1974) and *C. fluminea* (Lemaire-Gony and Boudou, 1997), there are three types of cilia on the outer surface of some epithelial cells of the gill filaments: frontal, latero-frontal and lateral cilia. In *D. rhombeus fontainianus* (Avelar and Cunha, 2009), the denomination latero-frontal cilia was substituted by eulatero-frontal cilia. In the present study, the terms first applied in the description of the gills of the genus *Diplodon* were used.

Each type of cilia type plays a fundamental role in the transport and uptake of nutrients in the frontal zone of the gill filament. Frontal cilia transport particulate material to the palps. In *D. rotundus gratus* (Hebling and Penteado, 1974) and *D. rhombeus fontainianus* (Avelar and Cunha, 2009), latero-frontal cilia of a filament alternate with those of the adjacent filament, forming a network that prevent the passage of larger particles into the interior of the demibranch. The gill filaments of *D. expansus* have latero-frontal cilia whose length, disposition and morphology resemble those of the species of the genus *Diplodon*, previously described. In this sense, the latero-frontal cilia of the gill filaments of the species studied also seems to help in the selective function of the food particles.

In comparison with *D. rotundus gratus* (Hebling and Penteado, 1974) and *D. rhombeus fontainianus* (Avelar and Cunha, 2009), the bivalve *D. expansus* has considerably longer lateral cilia. The lateral cilia are responsible for pumping water into the bivalve shell (David and Fontanetti, 2005) and transporting water through the ostia, creating the food and

respiratory flow (Jorgensen, 1976). Thus, the food and respiratory functions may be optimized due to the presence of longer lateral cilia in the species studied.

The abfrontal surface of the gill filaments is not directly involved with feeding process, since the capture of food particles occurs on the frontal surface of the epithelium (Dufour and Beninger, 2001). However, some elements related to the processing of alimentary particles, such as cilia and mucus, are present in the abfrontal surface of the gills of *D. expansus*.

The cilia are scarce and the mucocytes rich in acid polysaccharides are more frequent in the abfrontal zone of the gill filament of the species studied, similar situation that is found for the eulamellibranch bivalve *Spisula solidissima* (Dufour and Beninger, 2001). In *D. expansus*, the cilia found in the abfrontal zone of the filaments do not seem to be related to the creation of water flow, since such cilia are short and in little number when compared to the lateral cilia that admittedly perform this function. Possibly these structures appear as vestigial along the evolution of bivalves (Dufour and Beninger, 2001) or plays the sensorial function, as previously discussed by Atkins (1936).

According to Beninger et al. (1997), the presence of mucocytes in the abfrontal zone of eulamellibranch bivalves, such as *D. expansus*, occurs due to the need of a great lubrication of this region in order to diminish the friction between water and epithelium, since the water pumped through the gill filaments is directed to the abfrontal chambers (present in the interlamellar space) of reduced volume. In limninc bivalves, gills secrete mainly acid mucosubstances, which help in the transport of food particles and in the formation of a protective and lubricant mucous layer (Kale and Patil, 1977). The mucus of acid nature like those found in the mucocytes of *D. expansus* is highly viscous and considered a good lubricant, since it is not easily hydrated or removed from the epithelium (Faillard and Schauer, 1972; Hunt, 1970). Therefore, it is possible that the mucus secreted in the abfrontal zone of *D. expansus* acts as an effective lubricant, considerably reducing the attrition between water and epithelium.

In the intermediate zone of the gill filaments of *D. expansus*, mucocytes rich in acid polysaccharides were also found. In the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*, the mucocytes rich in acid polysaccharides occurred in the frontal zone of the filament, while mucocytes rich in neutral polysaccharides were observed in the abfrontal zone (Gómez-Mendikute et al., 2005). In the estuarine bivalve *Mytella falcata*, mucocytes rich in neutral polysaccharides were often observed in the abfrontal zone of the filament. Such cells were

also observed in the frontal zone near the intermediate zone of the filament (David et al., 2008). In animals exposed to pollutants, the authors found that the increase in the number of mucocytes occurred preferentially in the frontal zone of the filament (David and Fontanetti, 2009).

In the gill filament of the marine bivalve *Mya arenaria*, the arrangement of the mucocytes rich in acid polysaccharides occurs similarly to the observed in *D. expansus*, however, such cells are less abundant in the abfrontal zone of the marine bivalve (Beninger et al., 1997). The authors affirm that it is unlikely that the mucous secreted in the intermediate zone be transported toward the frontal zone, since the lateral cilia beat in opposite direction and are separated from the latero-frontal cilia by non-ciliated cells. Since residues of mucous are found in the frontal zone of the filaments, the authors pointed out the need to conduct further investigations in order to verify the possible existence of a glandular system integrated to these mucocytes that would make possible the direct secretion of mucus on the frontal zone of the filament.

The information obtained in this study showed that the gills of the Brazilian endemic bivalve *D. expansus* are typical of eulamellibranch bivalves and are suitable for histopathological studies applied on the effects of water pollutants. Important peculiarities never related in detail before showed the morphological and histochemical differences in bivalve species gills such as the constitution of the structure supporting the haemolymph vessel and the simultaneous presence of two specialized structures that play an important role in the structural maintenance of the gills, the skeletal rod and skeletal loop. Ultrastructural studies will be carried out in order to provide morphological detailing of the structures and cells that compose the gill filaments of the bivalve.

Acknowledgments

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant n. 2009/12489-9. The authors thank Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar and Dr. Cláudia Tasso Callil for the specimens identification; Cristiane M. Mileo for the illustrations; Mônica Iamonte, Antonio Teruyoshi Yabuki and Gerson Mello de Souza for the technical support; Marcos Perdiza for the support during the collection of the animals; and the biologists Cintya Aparecida Christofolletti, Raphael Bastão de Souza, and Ana Claudia de Castro Marcato for their help during the experiments.

References

- Alyakrinskaya, I.O., 2003. Tissue hemoglobins in Bivalvia (Mollusca). *Biology Bulletin*, 30, 617-626.
- Atkins, D., 1936. On the ciliary mechanisms and interrelationships of lamellibranchs. I. New observations on sorting mechanisms. *Q.J. Microsc. Sci.* 79, 181-308.
- Avelar, W.E.P., 1999. Moluscos Bivalves, in: Ismael, D., Valentin, W.C., Matsumara-Tundisi, T., Rocha, O. (Eds.), *Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Invertebrados de água doce*, pp. 65-68. Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), São Paulo.
- Avelar, W.E.P., Cunha, A.D., 2009. The anatomy and functional morphology of *Diplodon rhombeus fontainianus* (Orbigny, 1835) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae). *Braz. J. Biol.* 69, 1153-1163.
- Beninger, P.G., Dufour, S.C., Bourque, J., 1997. Particle processing mechanisms of the eulamellibranch bivalves *Spisula solidissima* and *Mya arenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 150, 157-169.
- Colville, A.E., Lim, R.P., 2003. Microscopic structure of the mantle and palps in the freshwater mussels *Velesunio ambiguus* and *Hyridella depressa* (Bivalvia: Hyriidae). *Molluscan Research*, 23, 1-20.
- Curial, O., Lange, R.R., 1974a. Hermafroditismo em *Diplodon delotundus expansus*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 17, 109-110.
- Curial, O., Lange, R.R., 1974b. Observações sobre a proporção de sexos em *Diplodon deodontus expansus*. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 17, 111-112.
- Curial, O., Lange, R.R., 1975. Variações histológicas sazonais das gônadas do *Diplodon delodontus expansus* (Küster) (Mollusca, Unionidade). *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, 18, 65-67.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. Brazilian Journal of Morphological Sciences, 22, 203-210.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2009. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. Water Air Soil Pollut. 203, 261–266.

David, J.A.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008. Fine structure of *Mytella falcata* (Bivalvia) gill filaments. Micron, 39, 329-336.

Dufour, S.C., Beninger, P.G., 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. Mar. Biol. 138, 295–309.

Faillard, H., Schauer, R., 1972. Glycoproteins as lubricants, protective agents, carries, structural proteins and as participants in other functions, in: Gottschalk, A. (Ed.), Glycoproteins. Their composition, structure and function, part B, vol. 5, pp. 1246-1267. Elsevier, Amsterdam.

Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., Cajaraville, M. P., 2005. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. Cell Tissue Res. 321, 131-140.

Gregory, M.A., George, R.C., 2000. The structure and surface morphology of the gill filaments in the brown mussel *Perna perna* Afr. Zool. 35, 121-129.

Gregory, M.A., George, R.C., McClurg, T.P., 1996. The architecture and fine structure of gill filaments in the brown mussel *Perna perna*. S. Afr. J. Zool. 31, 193-206.

Gregory, M.A., Marshall, D.J., George, R.C., Anandraj, A., McClurg, T.P., 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. Mar. Pollut. Bull. 45, 114-125.

Hebling, N.J., Penteado, A.M.G., 1974. Anatomia funcional de *Diplodon rotundus gratus* Wagner, 1827 (Mollusca, Bivalvia). Rev. Brasil. Biol. 34, 67-80.

- Henry, R., Simão, S.A., 1984. Evaluation of density and biomass of a bivalve population (*Diplodon delodontus expansus*) (Küster, 1856) in a small tropical reservoir. *Revue D'Hydrobiologie Trocale*, 17, 309-318.
- Henry, R., Filoso, S., 1985. Spatial distribution of a bivalve population (*Diplodon delodontus expansus*) (Küster, 1856) in a small tropical reservoir. *Rev. Brasil. Biol.* 45, 407-415.
- Henry, R., Filoso, S., 1987. Nutrient Release Through Decomposition of *Diplodon Delodontus Expansus* (Mollusca, Bivalvia) and Some Considerations of its Effects on the Ecology of a Small Tropical Reservoir. *Rev. Brasil. Biol.* 47, 479-486.
- Hunt, S., 1970. Polysaccharides-protein complexes in invertebrates. Academic Press, London.
- Jorgensen, C.B., 1976. Comparative studies on the function of gills in suspension feeding bivalves, with special reference to effects of serotonin. *Biol. Bull.* 151, 331-343.
- Junqueira, L.C.U., Junqueira, M.M.S., 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Livraria Editora Santos, São Paulo.
- Kale, G.S., Patil, V.Y., 1977. Histochemical studies on the mucosubstances in the gill of freshwater mussels, *Parreysia corrugata* var. *nagpoorensis* (Lea). *Acta Histochem.* 59, 1-7.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 11, 137-140.
- Lemaire-Gony, S., Boudou, A., 1997. Mantle and gill fine structure in freshwater Asiatic clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Annls Limnol.* 33, 163-178.
- Mansur, M.C.D., 1999. Gloquídio de *Diplodon martensi* (Ihering) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) e seu ciclo parasitário. *Rev. Bras. Zool.* 16, 185-194.

Mansur, M.C.D., Santos, C.P., 2008. Invertebrados Aquáticos: *Diplodon Expansus*, in: Machado, A.B.M., Drummond, G.M., PAGLIA, A.P. (Eds.), Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção, pp. 197-198. Fundação Bioversitas, Belo Horizonte.

Mantecca, P., Vailati, G., Bacchetta, R., 2006. Histological changes and micronucleous inductions in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure. *Histol. Histopathol.* 21, 829-840.

Nakao, T., 1975. The fine structure and innervation of gill lamellae in *Anodonta*. *Cell Tiss. Res.* 157, 239-254.

Pearse, A.G.E., 1985. *Histochemistry: Theoretical and Applied*. Churchill, London.

Peltier, G. L., Meyer, J.L., Jagoe, C.H., William, A., Hopkins, W.A., 2008. Using trace element concentrations in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in an urban river. *Environmental Pollution*, 154, 283-290.

Silverman, H., Lynn, J.W., Dietz, T.H., 2000. In vitro studies of particle capture and transport in suspension-feeding bivalves. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1199-1203.

Vilela, I.V., Oliveira, I.M., Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutat. Res.* 605, 78-86.

Villar, C., Stripeikis, J., D'Huicque, L., Tudino, M., Troccoli, O., Bonetto, C., 1999. Cd, Cu, and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de La Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia*, 416, 41-49.

Zupan, I., Kalafatic, M., 2003. Histological effects of low atrazine contamination on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 688-695.

Table 1. Results of the histochemical tests applied in the gill filaments of the bivalve *D. expansus*.

Filament Zones	Structure	Histochemical Tests Applied						
		Total Protein		Polysaccharides		Collagen		Calcium
		Bromophenol Blue	Neutral	Acid	Picrosirius	Mallory Trichromic	Von Kossa	
	Skeletal rod	-	+++	-	+++	+++	+++	+++
	Skeletal loop	+	+	-	+	-	-	-
Frontal	Ciliated cell	+++	++	-	-	-	-	-
	Postlatero frontal cell	+++	+	-	-	-	-	-
Intermediate	Absorptive cell	++	++	-	-	-	-	-
	Mucocyte	-	-	+++	-	-	-	-
Abfrontal	Ciliated Cell	++	++	-	-	-	-	-
	Non-ciliated absorptive	+	++	-	-	-	-	-
	Mucocyte	-	-	+++	-	-	-	-
	Basal membrane	-	+++	-	-	-	-	-

+++ strongly positive; ++ moderately positive; + weakly positive; - negative

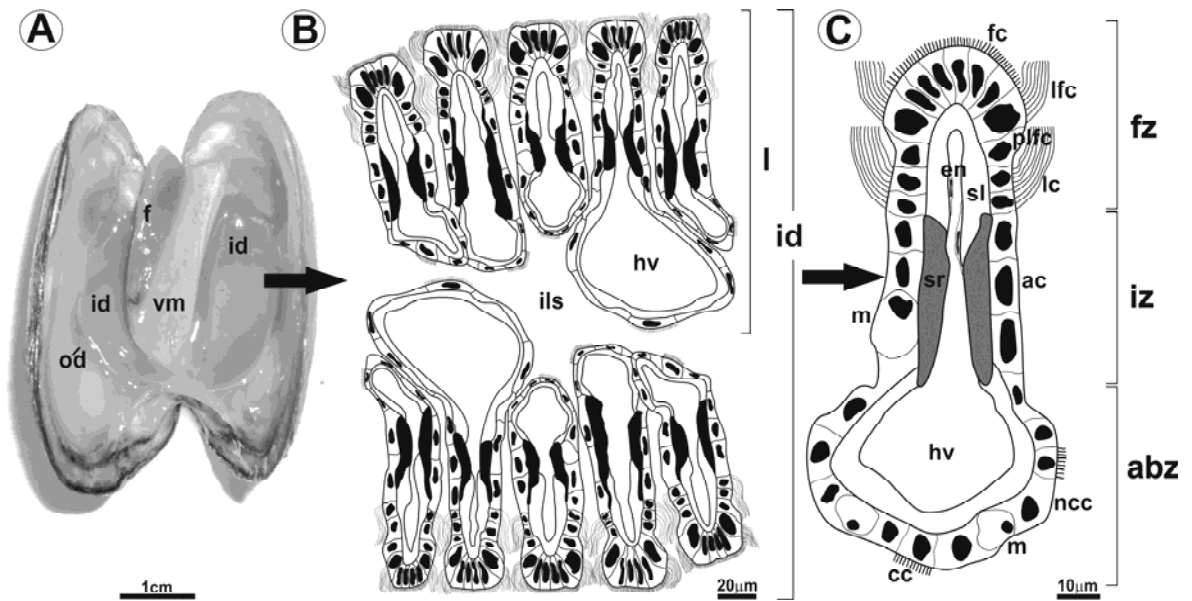


Figure 1. Gills (A), demibranch (B) and gill filament (C) of the bivalve *D. expansus* (A). vm= visceral mass, f= foot; od= outer demibranch; id= inner demibranch; ils= interlamellar space; hv= haemolymph vessel; l= lamella; fz= frontal zone; iz= intermediate zone; abz= abfrontal zone; fc= frontal cell; lfc= latero-frontal cell; plfc= post-lateral frontal cell; lc= lateral cell; ac= absorptive cell; ncc= non-ciliated cell; cc= ciliated cell; m= mucocyte; en= endothelial cell; sl= skeletal loop; sr= skeletal rod.

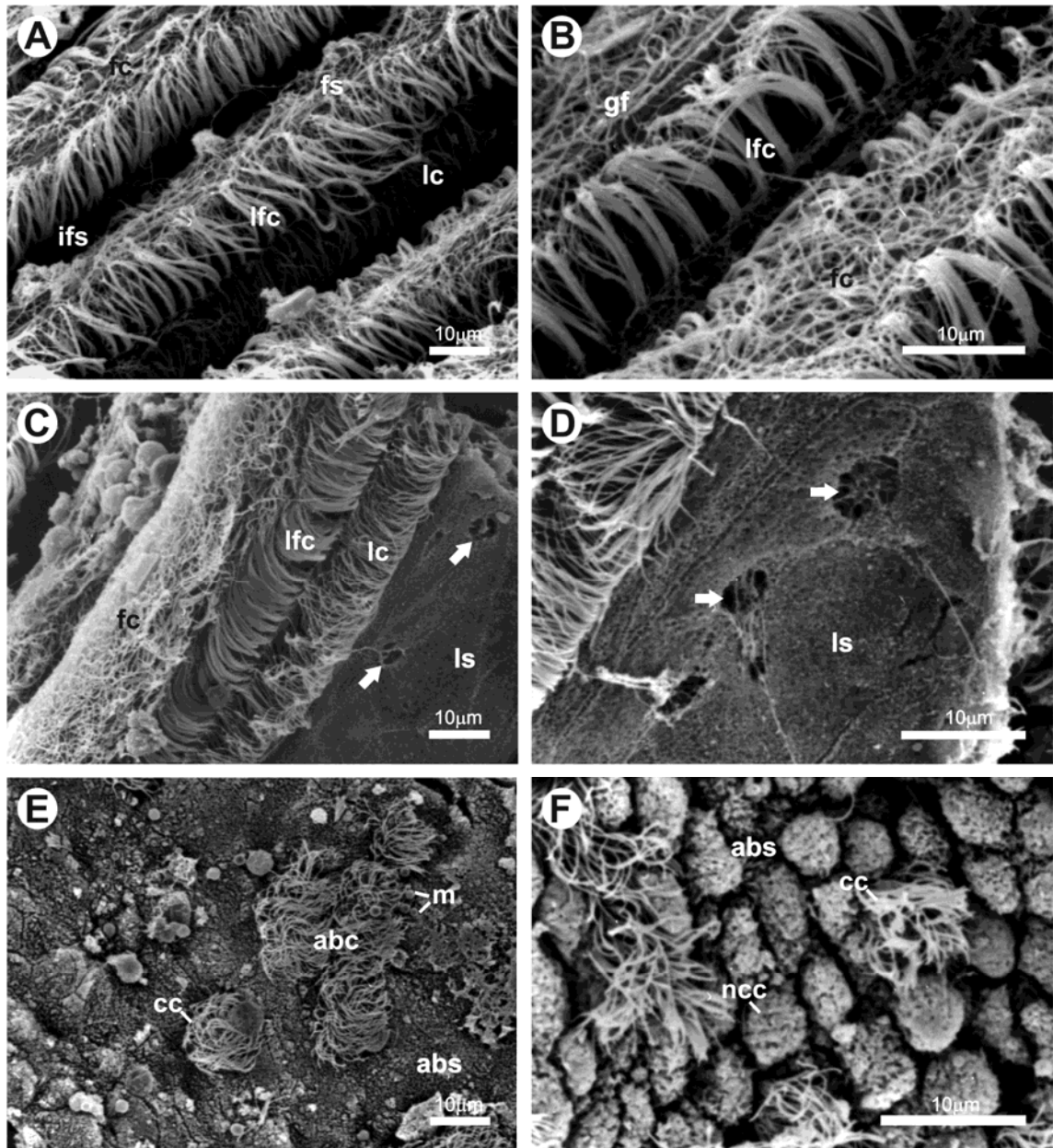


Figure 2. Scanning electron micrographs of the gills of the bivalve *D. expansus*. Frontal surface (A; B), lateral surface (C; D) and abfrontal surface (E; F) of the gill filaments. gf= gill filament; ifs= interfilamentar space; fs= frontal surface; ls= lateral surface; abs= abfrontal surface; fc= frontal cilia; lfc= latero-frontal cilia; lc= lateral cilia; abc= abfrontal cilia; cc= ciliated cells; ncc= non-ciliated cells; m= mucus; arrows in C and D= aquifer ducts.

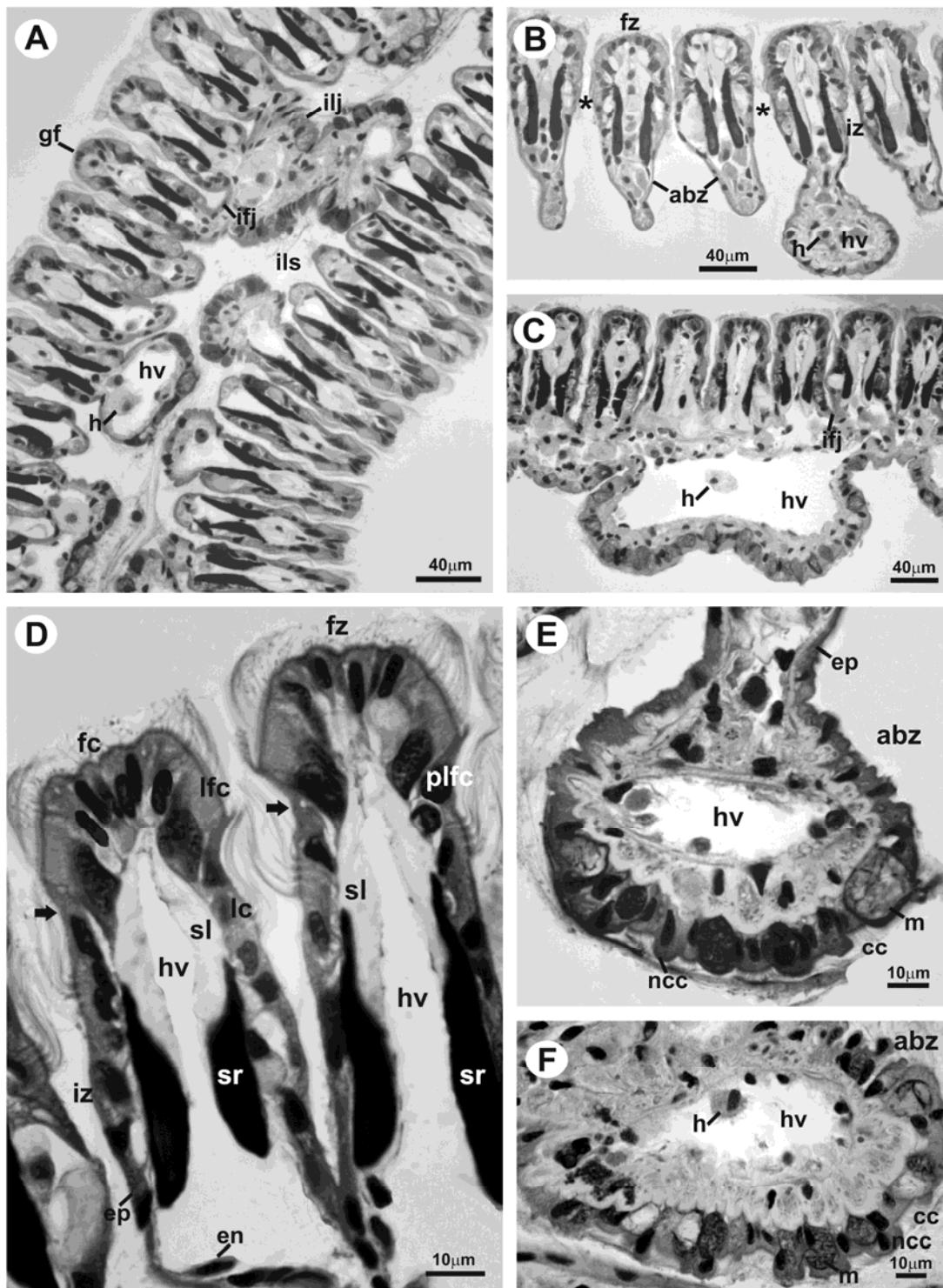


Figure 3. Gill filaments of *D. expansus* stained with Harris haematoxylin and eosin. gf= gill filaments; ils= interlamellar space; ifj= interfilamentar junction; ilj= interlamellar junction; hv= haemolymph vessel; h= haemocyte; sr= skeletal rod; sl= skeletal loop; ep= epithelium; en= endothelium; fz= frontal zone; iz= intermediate zone; abz= abfrontal zone; fc= frontal cells; lfc= latero-frontal cells; plfc= post-lateral frontal cell; lc= lateral cells; cc= ciliated cell; ncc= non-ciliated cell; m= mucocyte; *= ostia; arrows= narrowing of the gill filament.

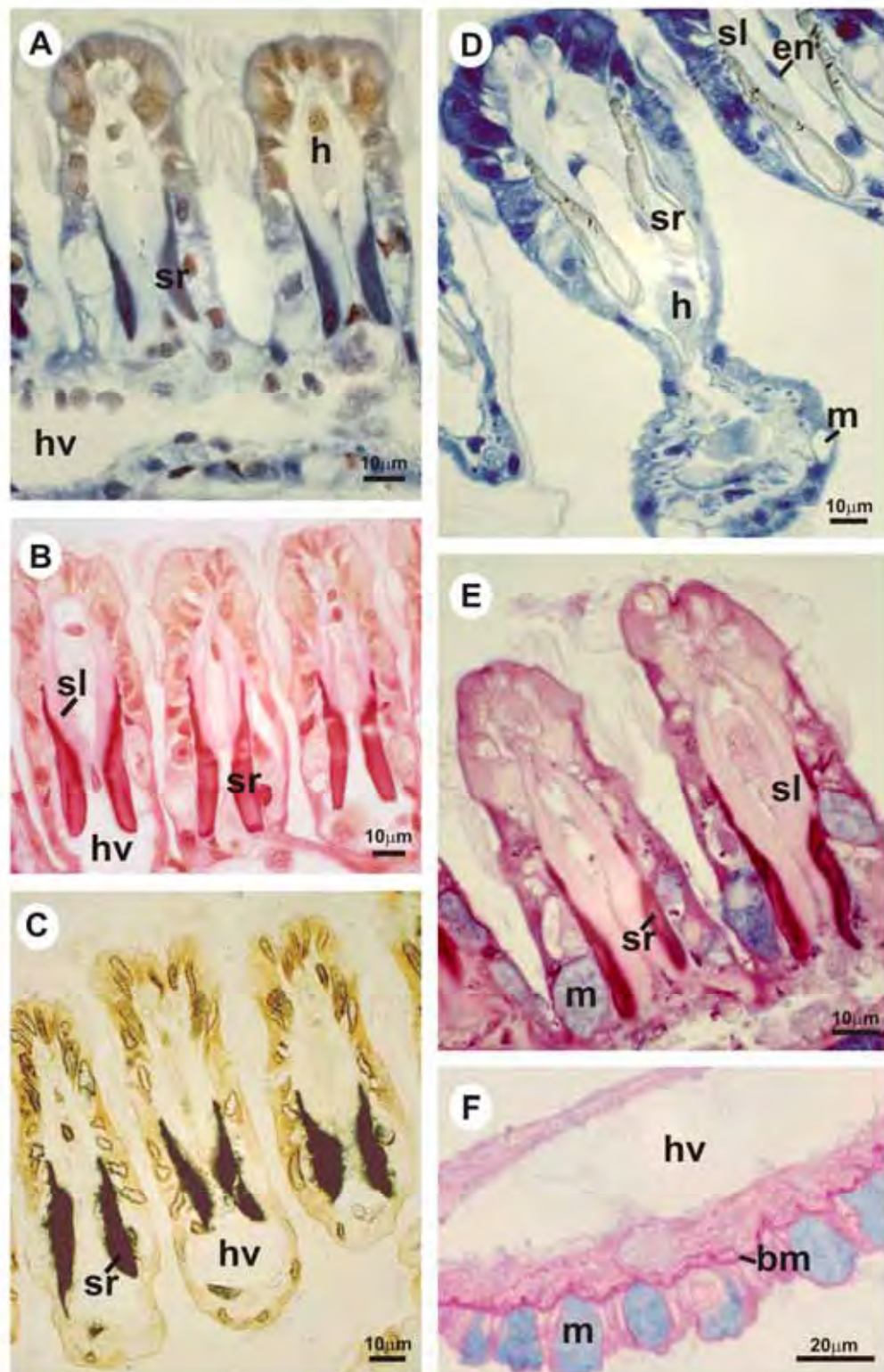


Figure 4. Gill filaments of *D. expansus* submitted to the histochemical techniques of Mallory trichromatic (A), picrosirius (B), von Kossa (C), bromophenol blue (D) and simultaneous PAS and Alcian blue (E; F). sr= skeletal rod; sl= skeletal loop; h= haemocyte; en= endothelium; hv= haemolymph vessel; m= mucocyte; bm= basal membrane.

7.2. CAPÍTULO 2

Surface morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) gill filaments after exposure to environmentally relevant concentrations of atrazine herbicide

Larissa Rosa Nogarol; Ana Luiza Brossi-Garcia & Carmem Silvia Fontanetti^{1*}

UNESP, São Paulo State University, Av. 24A, nº 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

* Corresponding author

E-mail address: fontanet@rc.unesp.br

Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135.

Artigo publicado no periódico Microscopy Research and Technique, 2011.

DOI 10.1002/jemt.21130

Resumo

A espécie endêmica brasileira *Diplodon expansus* (Küster, 1856) é encontrada em corpos de água doce no sudeste do país, em regiões de grande influência antropogênica com destaque para a agricultura. Um dos principais defensivos agrícolas utilizados na região de ocorrência da espécie é o herbicida atrazina, o qual possui grande potencial de contaminação dos ambientes aquáticos. Assim, esse estudo buscou investigar as possíveis alterações na superfície dos filamentos branquiais do bivalve, após exposição aguda a diferentes concentrações do herbicida. As principais alterações observadas foram o acúmulo do muco na superfície frontal dos filamentos, desorganização dos cílios na superfície frontal e perda dos cílios das células frontais. Como observado em outros estudos, o aumento da secreção de muco na região frontal dos filamentos agiu como um mecanismo de proteção do filamento. A desorganização dos cílios da superfície frontal dos filamentos e a perda dos cílios das células frontais poderão causar prejuízos funcionais das brânquias, comprometendo a captação de partículas alimentares e a respiração.

Palavras-chave: molusco; pesticida; MEV; ctenidia.

Surface Morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856; Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) Gill Filaments After Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine Herbicide

LARISSA ROSA NOGAROL,¹ ANA LUIZA BROSSI-GARCIA,^{2,3} AND CARMEM SILVIA FONTANETTI^{1*}

¹Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil

²Department of Zoology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil

³Center of Environmental Studies, São Paulo State University (UNESP), Rio Claro, SP, Brazil

KEY WORDS mussel; pesticide; SEM; ctenidia

ABSTRACT Brazilian endemic species *Diplodon expansus* (Küster, 1856) is found in freshwater bodies in the country's southeast, in large anthropogenic influence regions especially with an extensive agriculture emphasis. One of the main pesticides used in the species occurrence region is the atrazine herbicide, which has a great contamination potential in the aquatic environment. Therefore, several studies into its toxicity in aquatic systems have been developed. However, the tested concentrations are usually very high and rarely found in the environment and the short-term exposure responses in other aquatic organisms such as native bivalves are still scarce. Thus, this study sought to consider the potential effects of environmentally realistic concentrations of atrazine herbicide on the surface morphology of gill filaments of the bivalve *D. expansus* under laboratory-controlled conditions after short-term exposure. None of the animals died before the end of the experiment. The main alterations were observed on the frontal surface of filaments, which include mucus accumulation, cilia loss, and disruption. Mucus increased secretion and accumulation in the frontal filaments region preceded as a protective mechanism. Cilia loss and disruption on the frontal surface of the gill filament indicated that ciliated frontal cells were more sensitive to atrazine exposure and these alterations may cause gills functional damages, compromising the uptake of food particles and respiration. Therefore, higher sublethal concentrations of atrazine may compromise the survival and consequently the population of *D. expansus* in agriculture areas after a longer period of continuous exposure. *Microsc. Res. Tech.* 00:000–000, 2011. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

The aquatic biota is constantly exposed to a wide number of toxic substances released into the environment, which results in compromising the health of the organisms that inhabit these ecosystems and reducing the environmental quality. These xenobiotic compounds are mainly from anthropogenic activities and are originated from several emission sources such as industrial effluents, domestic sewage, and agricultural activities (Arias et al., 2007).

The main contaminants from agricultural origin are remaining fertilizers and pesticides. When applied over cultivation fields, the pesticides may reach freshwater bodies directly or indirectly and accumulate in the biota as shown in fish and aquatic invertebrates' studies (Jacomini et al., 2006; Preez and Vuren, 1992; Solomon et al., 1996).

Among the pesticides with greatest contamination potential on water bodies, the atrazine herbicide is highlighted (Eisler, 1989; Marchini et al., 1988), as one of the most used in the world (Zupan and Kalafatic, 2003), mainly in the regions where sugar cane cultures predominates, for example, Brazil's southeastern in Corumbataí River basin region (Armas et al., 2005).

Due to its physicochemical properties, atrazine is considered stable in the environment so its use can cause damages to biota (Jacomini et al., 2003).

This herbicide bioaccumulation in limnic mussels was significant, whereas the concentrations in visceral mass became 30 times higher than water concentration after 48 h of exposure (Jacomini et al., 2006). Morphological (Zupan and Kalafatic, 2003) and behavioral alterations (Flynn and Spellman, 2009) were also found in limnic bivalves exposed to different concentrations of the same pesticide.

Among the aquatic organisms, bivalve mussels have been widely used as a model in biomonitoring marine and limnic environments, due to their filter-feeding and sedentary habits and bioaccumulation potential of metals and organic compounds in their tissues (Gregory et al., 1999; Jacomini et al., 2006; Naimo, 1995). However, ecotoxicological studies using limnic bivalves as bioindicators have

*Correspondence to: Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24A, no 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, São Paulo, Brazil. E-mail: fontanet@rc.unesp.br

Received 8 September 2011; accepted in revised form 8 November 2011

DOI 10.1002/jemt.21130

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

being conducted mainly with invasive exotics species such as *Dreissena polymorpha* (Mantecca et al., 2006; Zupan and Kalafatic, 2003) and *Corbicula fluminea* (Peltier et al., 2008; Villar et al., 1999), being less known the exposure response to these pollutants in endemic species.

Individuals of *Diplodon expansus* species (Küster, 1856), endemic to Brazil, live buried in muddy substrates, occurring in running water environments, usually in rivers that drain toward Atlantic, in Rio de Janeiro and São Paulo states, or to upper Paraná River, as Tietê River (Mansur and Santos, 2008). Once this species occurrence area includes the surrounding ecosystems of the densely populated and agricultural regions of Brazil's southeastern, these invertebrates are exposed to a variety of potentially toxic wastes such as atrazine herbicide.

Thus, this research aimed to analyze the gill filaments surface of the Brazilian endemic species *D. expansus*, occurring in the countries' intense agricultural activity regions, after short-term exposure to different concentrations of atrazine herbicide. The concentrations used in this semi-static bioassay can be considered environmentally realistic, since they are usually found in aquatic ecosystems.

MATERIALS AND METHODS

Tested Substance

Atrazine is a selective herbicide from triazines chemical group and its composition is 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine. This pesticide is classified as mildly toxic to humans beings (class III) and very dangerous for the environment (class II). The commercial product Atrazine Nortox 500 SC[®] was used in a concentrated suspension form, which is used to control weed both as under pre-emergence application as in untimely post-emergency in premature corn crops, sugar cane, and sorghum.

Test Organisms

D. expansus specimens (average weight $\pm$ SD = 14.15 ± 7.8 g; average length $\pm$ SD = 4.29 ± 0.84 cm) were collected in Ribeirão Claro River, in Rio Claro region (S 22°24'33.1"; W 47°32'25.1"), São Paulo, Brazil on April 2010. To ensure the low levels of anthropogenic impact in the collect location, local water samples were collected following specific recommendations (CETESB, 1987; Cogherh, 2001) and immediately sent for metals and pesticides quantification.

In the laboratory, the animals were acclimated in 30 L capacity aquariums containing only water from artesian well for 24 h, temperature of $\pm 25^\circ\text{C}$, constant aeration, and 12 h light/dark cycle. This procedure was adopted to minimize the stress influence in the animals caused by the collecting and transportation.

Chemical Analyses

After water samples collection, the bottles were packed in thermal boxes with recyclable ice and sent to TASQA Serviços Analíticos Ltda. laboratory (Paulínia, São Paulo, Brazil), where chemical analyses were carried out.

Organic parameters (atrazine, glyphosate, 2,4-D) and inorganic (dissolved aluminum, total cadmium, total lead, dissolved copper, dissolved iron, total manganese, total nickel, total silver, total zinc) present in the resolution of the Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) were used to evaluate water samples quality.

The atrazine and 2,4-D residue analysis was carried out by applying the EPA 8270D method to determinate the concentration of semi volatiles organic compounds and to the glyphosate, the EPA 547 method was applied.

For metals quantification, water samples were subjected to SM213120B method, utilized in elements quantification for atomic emission spectrophotometry in inductively coupled argon plasma, in aqueous extracts, and similar to EPA 6010B quantification method, after acid digestion in a closed system with microwave heating methods EPA 3015 for liquid samples and EPA 3052 for solid samples.

Metals and pesticides concentrations in water samples collected, where the animals inhabit were compared with maximum values allowed for freshwater water bodies present in CONAMA resolution no. 357 (2005). Freshwater in Brazilian territory is classified, accordingly to require quality for their main use. Therefore, this study has exploited values for classes I and II, which can be utilized for human consumption and aquatic communities' protection.

The water quality standards determined in this resolution establishes individual limits for each substance in each class and determines maximum concentration allowed. Concentrations over the acceptable represent commitment on water quality, for its predominant uses.

Bioassay Design

Six aquariums with 10 L capacity each were utilized: one aquarium as control group, containing only well water and other five, with different atrazine concentration (2, 6.25, 12.5, 25 e 50 $\mu\text{g/L}$) obtained by diluting to stock solution (0.5 g/L) in water.

The highest concentration (50 $\mu\text{g/L}$) consists of twice more than the indicated solution to agricultural use and the lowest (2 $\mu\text{g/L}$), the maximum concentration allowed in freshwater bodies by Brazilian legislation, as CONAMA resolution no. 357 (2005). Such concentrations were utilized to evaluate the indiscriminate pesticide application effects and the dilution effect of this herbicide in water bodies, approaching to environmentally realistic concentrations. Bioassays remained constantly aerated.

After the acclimation period, the animals were distributed randomly, being exposed five animals for 7 days in each aquarium to obtain the short-term exposure answer. This exposure time was used in earlier studies involving atrazine and limnic bivalves (Jacomini et al., 2006; Zupan and Kalafatic, 2003).

The experimental conditions consisted in a semi-static system, where 100% of the water volume in each bioassay was changed every 24 h, followed by the addition of the herbicide stock solution freshly prepared, with the intention of keeping the test solutions concentration. The temperature was kept between 23 and 25°C during the exposition time. The animals were not fed during the acclimation period and during the experimental exposure.

After 7 days of exposure, the mussels were anesthetized by thermal shock and had small fragments of their gills removed and fixed.

Scanning Electron Microscopy

Gills fragments were fixed in Karnovsky solution (Karnovsky, 1965) for 2 h and dehydrated in a series of

TABLE 1. Organic and inorganic parameters values found in samples of water from the animal collection site and maximum values allowed by the Brazilian legislation (CONAMA resolution no. 357)

	QL	Sample	CONAMA resolution no. 357 (2005)
Inorganic parameters			
Dissolved aluminum	0.07	0.09	0.10
Total cadmium	0.003	<QL	0.001
Total lead	0.03	<QL	0.01
Dissolved copper	0.003	<QL	0.009
Dissolved iron	0.002	0.2	0.3
Total manganese	0.002	0.08	0.1
Total zinc	0.006	<QL	0.18
Total nickel	0.005	<QL	0.025
Total silver	0.003	<QL	0.01
Organic parameter			
Atrazine	15	<QL	2
2,4-D	2	<QL	4
Glyphosate	60	<QL	65

QL, quantification limit. Values expressed in mg/L for inorganic parameters and µg/L for organic parameters.

increasing acetone concentrations. Subsequently, the material was taken to the critical point (Balzer CPD 030), fixed on metal holder and covered with gold using Sputtering Balzer SCD 050. The material was analyzed and photographed using a Philips scanning electron microscope, operated at 12 kV.

RESULTS

Water Chemical Analysis

The concentrations values of inorganic parameters dissolved aluminum, dissolved iron, and total manganese proved smaller than the maximum allowed under Brazilian legislation for classes I and II freshwaters (CONAMA, 2005).

On the other hand, the concentrations of all organic parameters and further inorganic parameters (total cadmium, total lead, dissolved copper, total nickel, total silver, and total zinc) could not be determined accurately, since the values were below the quantification limit of the utilized methods.

Chemical analysis of water samples collected where animals inhabit reveals that water quality is appropriate for aquatic communities' protection and even for human consumption after appropriate treatment as stipulated for freshwater bodies of classes I and II (CONAMA, 2005). Therefore, collected animals were in contact with unpolluted water as shown in Table 1.

Ultramorphology

All individuals of control and exposed groups did not die before the end of the experiment (7 days).

Control Group. The gill filaments confirmed total integrity in their frontal, lateral, and abfrontal surfaces. It was possible to observe the different cilia that line up the frontal surface of gill filaments called frontal cilia, latero-frontal cirri, and lateral cilia (Figs. 1A,B) and the region consisted of nonciliated cells located between the latero-frontal cirri and lateral cilia (Fig. 1B). The lateral surface has no cilia, only fissures that occur at regular intervals, called water ducts (arrow heads in Fig. 1C). On the abfrontal surface, it was observed ciliated cells, nonciliated cells, and mucus droplets (arrows in Fig. 1D).

Exposed Group. Some tested atrazine concentrations were able to cause ultramorphological alterations

in the gill filaments of *D. expansus*, mainly on their frontal surface. Such changes were more frequent and occurred in larger areas in the gill filaments of the animals exposed to higher herbicide concentrations (Table 2), revealing dose-dependent answers.

The animals exposed to the maximum concentration permitted by Brazilian legislation (2 µg/L) and a quarter of the concentration of agriculture use (6.25 µg/L) did not present any morphological changes. The cilia demonstrate the same distribution and integrity, however, the gill filaments of exposed animals to 6.25 µg/L of atrazine appeared covered by larger amounts of mucus (arrows in Figs. 2A,C) when compared with the control group. In some gill filaments, the lateral cilia appeared joined to each other due to mucus accumulation (Figs. 2B,C).

In the group exposed to half of agricultural concentration use (12.5 µg/L), gill filaments presented cilia disruption on frontal surface (Fig. 2D). It was proved an initial loss of frontal cilia in some filaments regions (* in Fig. 2E), as well as mucus presence in some filaments frontal surface (arrow in Fig. 2F).

Alterations observed in the animals exposed to half of the concentration of agricultural use (12.5 µg/L) were also highlighted in animals exposed to concentration indicated for agricultural use (25 µg/L). However, the frontal cilia loss has engulfed larger surfaces of the filament (Figs. 3A,B) and mucus accumulation occurred in a more apparent way (Fig. 3C).

The gill filaments integrity has been lost in the animals exposed to higher herbicide concentrations (50 µg/L). Some gill filaments lost their frontal cilia in extensive regions of the frontal surface (* in Figs. 3D,E) and others were completely covered by mucous layer (Fig. 3F).

DISCUSSION

Bivalves have great ability to accumulate metals (Naimo, 1995) and organic compounds such as the atrazine herbicide (Jacomini et al., 2006) in their tissues. These invertebrates gills are considered the main target organs in ecotoxicological studies (Bigas et al., 2001; Sunila, 1988), once they have a large surface in contact with circulating water, being able to accumulate high concentrations of different potentially toxic compounds as metals (Gregory et al. 1999) and evaluate the different compartments conditions such as water and sediment (David and Fontanetti, 2005).

The bivalves' survivability when submitted to unfavorable environmental conditions such as pollutants presence, is possible due to the protective function of the tissues that form gill filaments (Alyakrinskaya, 2003). Therefore, these tissues demonstrate early injuries signs caused by potentially toxic agents (Le Pennec et al., 1988). In this study, none of the exposed animals died during the experiment period and the highest concentrations of atrazine herbicide were capable of inducing morphological alterations in gill filaments' wide regions of the exposed surface.

Therefore, lack of mortality of animals exposed to atrazine showed that tested concentrations are sublethal for this species. Besides, ultramorphological analyses demonstrated a dose-dependent effect of atrazine herbicide as observed by Zupan and Kalafatic (2003) in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). After histological analyses of hepatopancreas and gonads, the authors

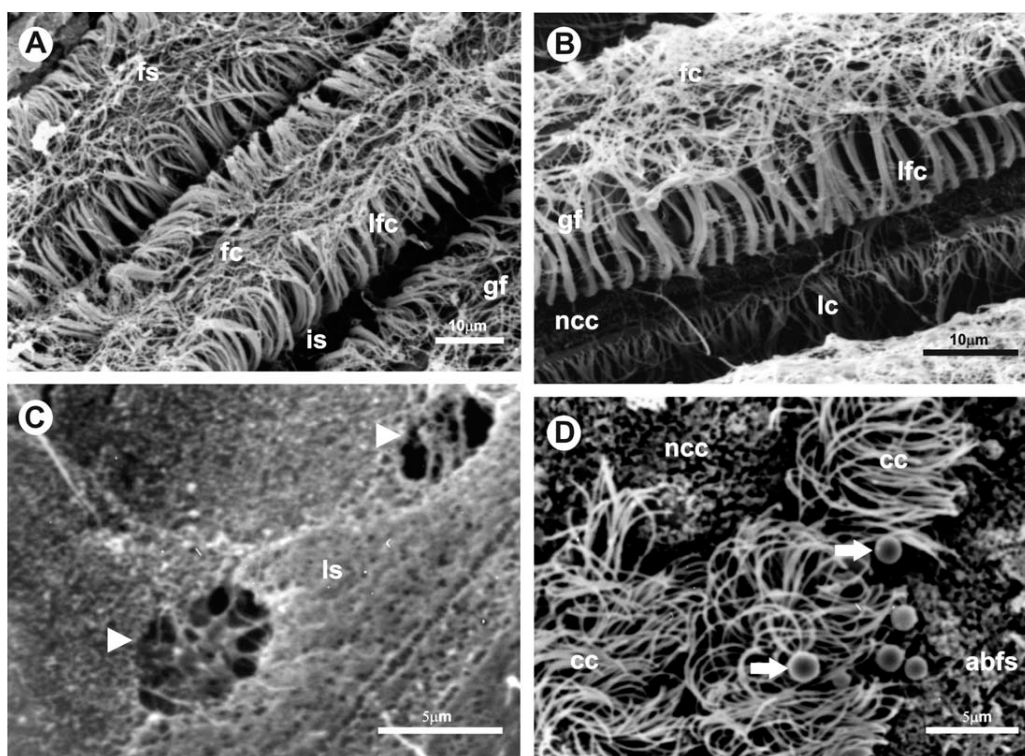


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the gills of the bivalve *D. expansus*. Control group. Frontal (A,B), lateral (C), and abfrontal (D) surfaces of gill filaments. gf, gill filament; is, interfilamentar space; fs, frontal surface; ls, lateral surface; abfs, abfrontal surface;

fc, frontal cilia; lfc, latero-frontal cirri; lc, lateral cilia; cc, ciliated cells; ncc, nonciliated cells; arrow heads in C, water ducts; arrows in D, mucus droplet.

TABLE 2. Alterations in the gill filaments of *D. expansus* after exposure to different concentrations of atrazine herbicide

Effects	Bioassay (μg/L)				
	2	6.25	12.5	25	50
Ciliar desorganization	–	–	+	++	++
Frontal cilia loss	–	–	+	++	+++
Mucus production increase	–	+	++	+++	+++

– absence of alteration; + rare alteration; ++ frequent alteration; +++ regular alteration in large areas of gill filaments.

observed the mildest effects at the lowest concentrations of this pesticide as observed in this study for gills.

Among observed changes, mucus accumulation in frontal surface of gill filaments rarely occurred in animals exposed to low herbicide concentrations and frequently in large regions in the animal's filaments surface exposed to higher concentrations of pesticide. The gill mucus of bivalves have indispensable role in many vital processes such as food particles capture and transportation, formation of pseudofeces, and prevention of water loss when animals are exposed to air (Sze and Lee, 1995).

Moreover, several studies dealing with metal toxicity show that mucus secretion increase is one of the answers from gill filaments exposed to pollutants (Kádar et al., 2001; Sze and Lee, 1995). Despite of the majority of studies on increased mucus production in bivalve gill filaments being performed with metals, David and Fontanetti (2005) observed that the estua-

rine bivalve *Mytella falcata* collected in regions contaminated mainly with organic pollutants of Santos estuary, São Paulo, Brazil, also demonstrated similar responses to animals exposed exclusively to metals. The results of this study also confirm that the mucus production increase is a general response to exposure to different contaminants kinds.

David and Fontanetti (2009) suggested that the mucus produced in the frontal zone of gill filament is responsible for the pollutant arrest and afterward elimination as pseudofeces. On the other hand, mucus produced in lateral and abfrontal zones is responsible for eliminating pollutants previously absorbed. The bivalve species *D. expansus* exhibits mucocytes only in the lateral and abfrontal zones of its gill filaments. Therefore, previous mucous production increase in the lateral and abfrontal zones led to mucous accumulation and consequently the formation of mucous layer in the frontal surface of gill filaments. These responses may arise as a protection mechanism to prevent the herbicide accumulation and entrance via gills and subsequent compromise the entire organism.

D. expansus species is an eulamellibranch and has gill filaments specialized in exerting two main functions: respiration and feeding. Bivalves use cilia present in their gill filaments to pump water through the inhalant siphon up to the mantle cavity (McMahon and Bogan, 2001). According to Jorgensen (1976), food particles entering in the mantle cavity suffer the action of three ciliar systems present in the filament:

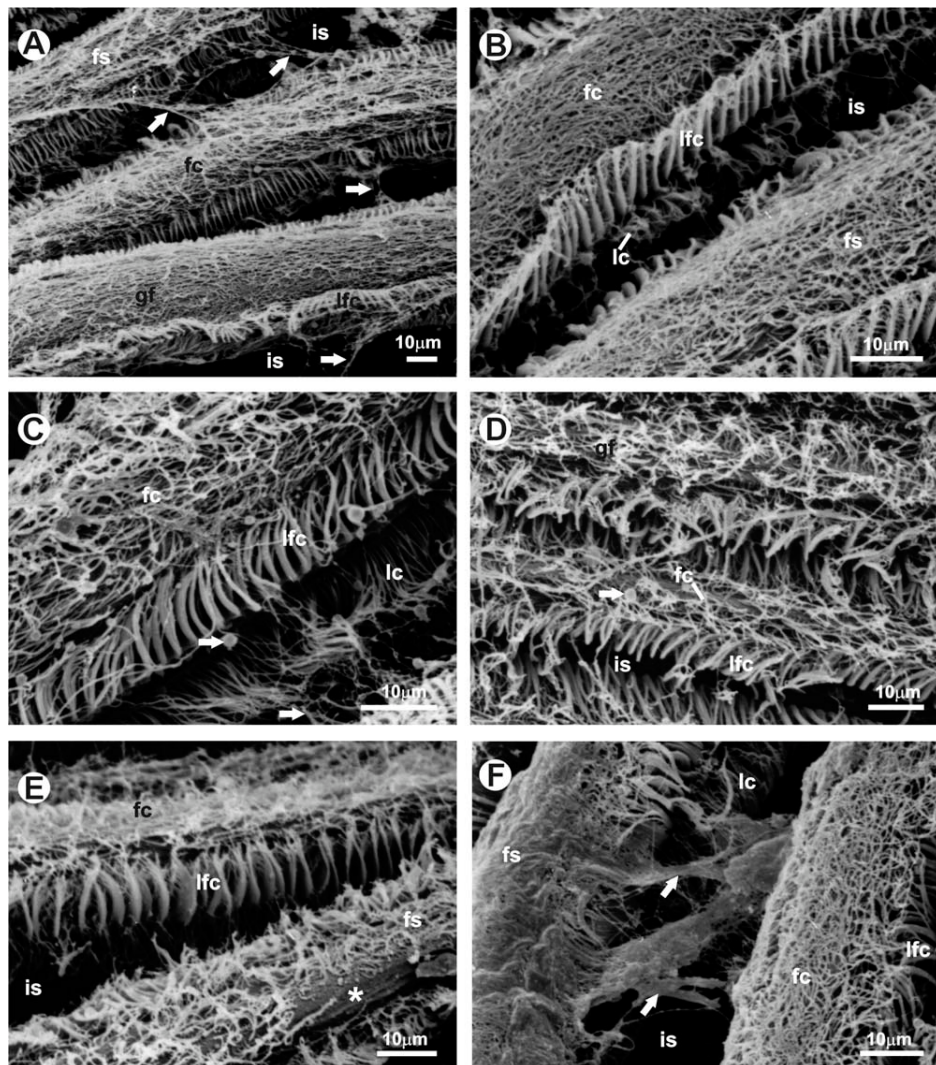


Fig. 2. Scanning electron micrographs of the gills of the bivalve *D. expansus*. Group exposed to a quarter of the concentration of agricultural use, 6.25 µg/L (A–C). Group exposed to half the concentration of agricultural use, 12.5 µg/L (D–F). gf, gill filament; is, interfilamentar space; fs, frontal surface; fc, frontal cilia; lfc, latero-frontal cirri; lc, lateral cilia; arrows, mucus; *, loss of cilia.

the lateral cilia transport water, the latero-frontal cirri intercept and retain suspension water particles, and the frontal cilia select and carry retained particles for the ciliated tract along the gill base or free demi-branch margins.

In this sense, the animals exposed to higher concentrations of herbicide will possibly reduce the efficiency of respiration and feeding processes due to cilia's organization commitment, loss of frontal cilia, and mucus accumulation in the frontal surface of filaments. In long term, if exposure continues the mussels may show more severe stress signs and consequently die. In *Perna viridis*, bivalves exposed to high concentrations of copper, it was observed decrease on filtration rates due to mucus production increase or mechanical and structural damage that blocked the ciliary movements (Nicholson, 2003).

Cilia loss in frontal surface of the gill filament was also observed in animals exposed to herbicide higher concentrations. Probably, the frontal cells that contain these cilia were more sensitive to higher pesticide concentrations and, consequently, the protection mechanisms at cellular level were not sufficient to maintain its integrity. Extensive areas where abfrontal surfaces of gill filaments exhibited cilia loss were reported in the study with *P. perna* mussel exposed to mercury (Gregory et al., 1999). The abfrontal cells of *P. perna* gill filaments were more sensitive to long-term mercury exposure since necrotic cells could be observed as a consequence of toxic insult.

According to the results obtained in this study, atrazine herbicide presents a dose-dependent response to exposure since the highest concentrations of this pesticide were able to induce ultramorphological alterations

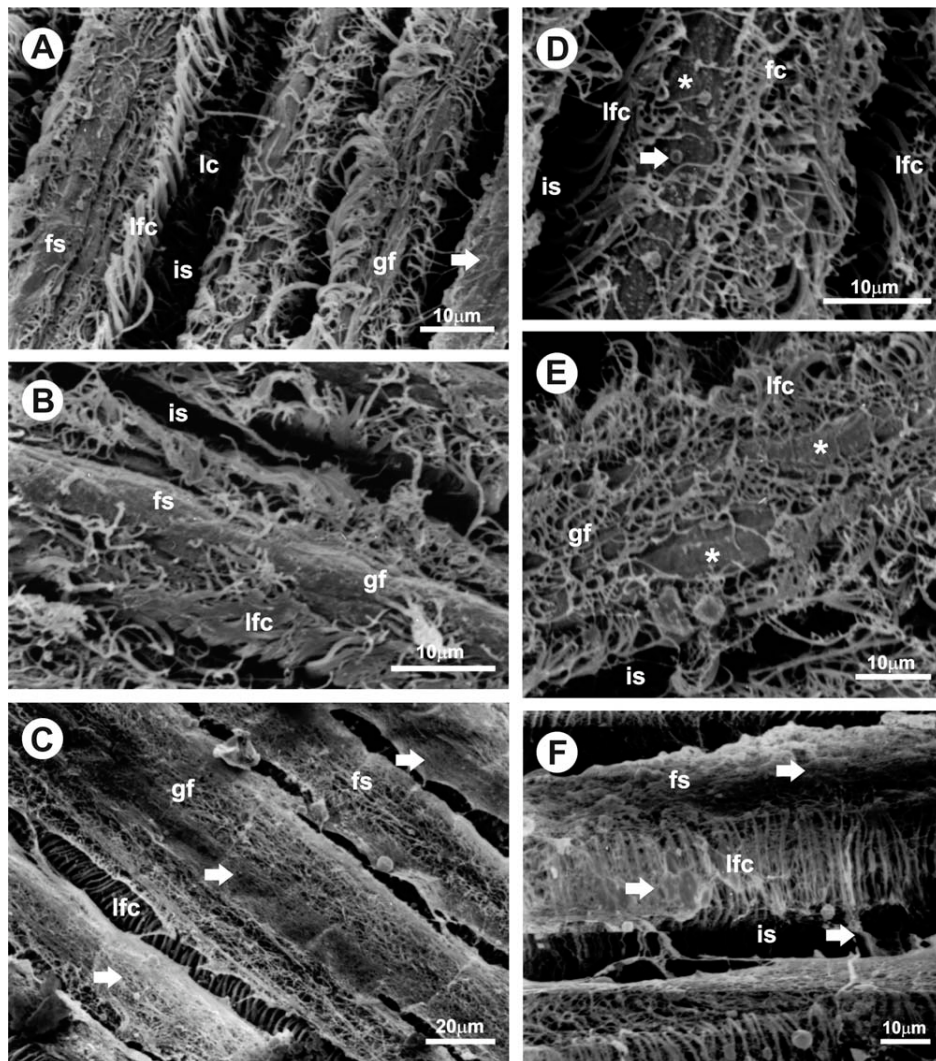


Fig. 3. Scanning electron micrographs of the gills of the bivalve *D. expansus*. Group exposed to agricultural use concentration, 25 µg/L (A–C). Group exposed to the double concentration of agricultural use, 50 µg/L (D–F). gf, gill filament; is, interfilamentar space; fs, frontal surface; fc, frontal cilia; lfc, latero-frontal cirri; lc, lateral cilia; arrows, mucus; *, loss of cilia.

into gill filaments surface of the bivalve *D. expansus*. Thus, the ultramorphological analyses of bivalves gill filaments may be a useful toxicity indicator and the indiscriminate use of the atrazine herbicide must be avoided, since it can cause damage that indirectly compromise vital functions on aquatic organisms such as the studied bivalve.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been supported by FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) Grant no. 2009/12489-9. The authors thank Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar and Dr. Cláudia Tasso Calil for the specimens identification; Mônica Iamonte and Antonio Teruyoshi Yabuki for the technical support; Marcos Perdiza for the support during the collection of the animals; and the biologists Raphael Bastão

de Souza, Cintya Aparecida Christofolletti, and Ana Claudia de Castro Marcato for their help during the experiments.

REFERENCES

- Alyakrinskaya IO. 2003. Tissue hemoglobins in Bivalvia (Mollusca). Biol Bull 30:617–626.
- Armas ED, Monteiro RTR, Amâncio AV, Correa RML, Guercio MA. 2005. O uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbatai e o risco de poluição hídrica. Quim Nova 28:975–982.
- Arias ARL, Buss DF, Albuquerque C, Inácio AF, Freire MM, Egler M, Mugnai R, Baptista DF. 2007. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. Ciênc Saúde Coletiva 12:61–72.
- Bigas M, Durfort M, Poquet M. 2001. Cytological effects of experimental exposure to Hg on the Gill epithelium of the European flat oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. Tissue Cell 33:178–188.
- CETESB. 1987. Guia de coleta e preservação de amostras de água. São Paulo: CETESB. 155p.

- Cogerh. 2001. Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água. Informe técnico n°.02. Fortaleza: Cogerh, p 20.
- CONAMA. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005. Available at: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. (Accessed on March, 2010).
- David JAO, Fontanetti CS. 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. *Braz J Morphol Sci* 22:203–210.
- David JAO, Fontanetti CS. 2009. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. *Water Air Soil Pollut* 200:1–6.
- Eisler R. 1989. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. *US Fish Wildl Serv Biol Rep* 85:1–55.
- Flynn K, Spellman T. 2009. Environmental levels of atrazine decreases patial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1228–1233.
- Gregory MA, George RC, Marshall DJ, Anandraj A, McClurg TP. 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Mar Pollut Bull* 39:116–121.
- Jacomini AE, Bonato PS, Avelar WEP. 2003. HPLC method for the analysis of atrazine in freshwater bivalves. *J Liquid Chromatogr Relat Technol* 26:1885–1894.
- Jacomini AE, Avelar WEP, Martinês AS, Bonato PS. 2006. Bioaccumulation of atrazine in freshwater bivalves *Anodonta trapesialis* (Lamarck, 1819) and *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). *Arch Environ Contam Toxicol* 51:387–391.
- Jorgensen CB. 1976. Comparative studies on the function of gills in suspension feeding bivalves, with special reference to effects of serotonin. *Biol Bull* 151:331–343.
- Kádár E, Salánki J, Jugdaohsingh R, Powell JJ, McCrohan CR, White KN. 2001. Avoidance responses to aluminum in the freshwater bivalve *Anodonta cygnea*. *Aquat Toxicol* 55:137–148.
- Karnovsky MJ. 1965. A formaldehyde–glutaraldehyde fixative at high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 11:137–140.
- Le Pennec H, Beninger PG, Herry A. 1988. New observations of the gills of *Placopecten magellanicus* (Mollusca: Bivalvia) and implications for nutrition. *Mar Biol* 98:229–237.
- Mansur MCD, Santos CP. 2008. Invertebrados aquáticos: *Diplodon expansus*. In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP, editors. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção. Belo Horizonte: Fundação Bioversitas. pp197–198.
- Mantecca P, Vailati G, Bacchetta R. 2006. Histological changes and micronucleous inductions in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure. *Histol Histopathol* 21:829–840.
- Marchini S, Passerini L, Cesareo D, Tosato ML. 1988. Herbicidal triazines: Acute toxicity on *Daphnia*, fish and plants and analysis of its relationships with structural factors. *Ecotoxicol Environ Saf* 16:148–157.
- McMahon RF, Bogan AE. 2001. Mollusca: Bivalvia. In: Trorp JH, Covish AP, editors. Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. San Diego: Academic Press. pp 331–429.
- Naimo TJ. 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4:341–362.
- Nicholson S. 2003. Cardiac and branchial physiology associated with copper accumulation and detoxication in the mytilid mussel *Perna viridis* (L.). *J Exp Mar Biol Ecol* 295:157–171.
- Peltier GL, Meyer JL, Jagoe CH, William A, Hopkins WA. 2008. Using trace element concentrations in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in an urban river. *Environ Pollut* 154:283–290.
- Preez HH, Vuren JHJ. 1992. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. *Comp Biochem Physiol* 101:651–655.
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall R J, Weiss-Kopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW, Jr, Williams WM. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environ Toxicol Chem* 15:31–76.
- Sunila I. 1988. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. *J Invertebr Pathol* 52:137–141.
- Sze PWC, Lee SY. 1995. The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar Pollut Bull* 31:390–393.
- Villar C, Stripeikis J, D'Huicque L, Tudino M, Troccoli O, Bonetto C. 1999. Cd, Cu and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de la Plata basin, Argentina. *Hydrobiologia* 416:41–49.
- Zupan I, Kalafatic M. 2003. Histological effects of low atrazine contamination on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). *Bull Environ Contam Toxicol* 70:688–695.

7.3. CAPÍTULO 3

Histopathology of the gill filaments of the Brazilian endemic bivalve *Diplodon expansus* after exposure to the herbicide atrazine

Larissa Rosa Nogarol; Ana Luiza Brossi-Garcia & Carmem Silvia Fontanetti*

UNESP, São Paulo State University, Av. 24A, no. 1515, CEP 13506-900, Rio Claro, SP, Brazil.

*Corresponding author

E-mail address: fontanet@rc.unesp.br

Full postal address: Department of Biology, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Av. 24 A, no. 1515, CP 199, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

Tel.: +55 19 35264139; fax: +55 19 35264135

Submetido ao periódico Ecotoxicology and Environmental Safety.

Resumo

Devido ao hábito sésil e filtrador e grande potencial de bioacumulação de metais e compostos orgânicos que apresentam, os moluscos bivalves vêm sendo amplamente utilizados em estudos de campo e laboratório que visam avaliar o potencial tóxico de inúmeros compostos lançados em rios, mares e estuários. Entretanto, a maioria dos estudos ecotoxicológicos utiliza espécies exóticas invasoras nas suas avaliações, sendo menos conhecidas as respostas de espécies nativas. A espécie endêmica brasileira *Diplodon expansus* ocorre em rios próximos a regiões de intensa atividade agrícola do país; o herbicida atrazina é hoje um dos principais resíduos encontrados em corpos d'água do território brasileiro. Desta forma, buscou-se investigar a toxicidade de diferentes concentrações desse herbicida em um representante da malacofauna nativa brasileira, por meio de análises histológicas, histoquímicas e ultraestruturais de seus filamentos branquiais. As células que compõem as zonas frontal e intermediária dos filamentos branquiais foram as mais afetadas pelo herbicida, sendo observadas respostas relacionadas ao dano, proteção e aumento do gasto energético. As respostas tissulares e celulares observadas revelaram-se dose-dependentes, sendo que as maiores concentrações do herbicida foram capazes de causar alterações severas em amplas regiões das brânquias. Provavelmente, a persistência das alterações observadas causará problemas funcionais graves nas brânquias desses animais, afetando negativamente seu desempenho e saúde.

Palavras-chave: histoquímica; MET; MEV; agrotóxicos; ctenidia.

Abstract

Due to their benthic filter-feeding habits and high bioaccumulation potential of metals and organic compounds, bivalve mollusks have been widely used in studies in the field and laboratory to assess the toxic effects of several compounds discharged in rivers, oceans and estuaries. However, most ecotoxicological studies use invasive exotic species, while the response of native species is poorly known. The Brazilian endemic species *Diplodon expansus* occurs in rivers near areas of intense agricultural activity, and atrazine is currently one of the main residues of pesticides found in water bodies of the Brazilian territory. This study was aimed at examining the toxicity of different atrazine concentrations to a Brazilian native mollusk by analyzing the histology, histochemistry, and ultrastructure of its gill filaments. The cells that comprise the frontal and intermediary regions of gill filaments were the most affected by the herbicide and responses associated to damage, protection, and increase in energy use were observed. The response of tissues and cells were dose-dependent. Higher concentrations of herbicide caused more severe alterations in large areas of the gills. The persistence of the alterations observed might result in severe functional problems in the gills of these animals, negatively affecting their performance and health.

Keywords: morphology; histochemistry; ultrastructure; agrochemical; mussel.

1. Introduction

The herbicide atrazine has been associated to several environmental problems, as it tends to dissipate in the environment, contaminating the soil and surface and ground waters (Sanches et al., 2003). This herbicide is one of the most widely used pesticides worldwide (Zupan and Kalafatic, 2003), especially in regions with a predominance of sugarcane plantations, such as in southeast Brazil in the Corumbataí River Basin (Armas et al., 2005). Because of its physical-chemical proprieties, atrazine is a stable compound in the environment (Jacomini et al., 2003; Yang et al., 2010), increasing the chances of exposure of the biota (Solomon et al., 2008) and bioaccumulation in the tissues of aquatic invertebrates, such as bivalve mollusks (Jacomini et al., 2006).

Bivalve mollusks exhibit several characteristics that make them good sentinel organisms, such as benthic filter-feeding habits, wide distribution, easily collected (Depledge, 1998; Gregory et al., 2002) and high bioaccumulation potential of metals and organic compounds (Gregory et al., 1999; Jacomini et al., 2006; Naimo, 1995). Thus, these invertebrates have been broadly used in ecotoxicological studies in marine, estuarine, and freshwater habitats.

Most ecotoxicological studies using bivalve mollusks in the biomonitoring of disturbed aquatic habitats or bioassays are focused on North America and Europe, especially using species of the genus *Mytilus* in marine habitats, as pointed out by Gregory et al. (2002) and David and Fontanetti (2005). In freshwater habitats, exotic invasive species from Asia have been used, such as *Dreissena polymorpha* (Mantecca et al., 2006; Zupan and Kalafatic, 2003) and *Corbicula fluminea* (Peltier et al., 2008; Simon et al., 2011).

In order to improve the accuracy of ecological assays, species commonly found in the southern hemisphere have recently received more attention in the assessment of disturbed habitats in these areas, such as those conducted by Brazilian and South-African research groups using the marine bivalve *Perna perna* (Abessa et al., 2005; Gregory et al., 1999; Gregory et al., 2002), the estuarine bivalve *Mytella falcata* (David and Fontanetti, 2005, 2009; David et al., 2008a), and the freshwater bivalves *Anadontites trapezialis* (Jacomini et al., 2003, 2006) and *Diplodon fontaineanus* (Jacomini et al., 2011).

The impact of pollutants in aquatic organisms can be assessed in different levels of biological organization, including histopathology (Akaishi et al., 2007). Histopathological analysis can provide information on the general health of the animal and changes in the tissues caused by the exposure to toxic agents (Fontanetti et al., 2010; Sunila, 1987). These

alterations may have an ecological significance, due to adverse or impaired effects on growth, reproduction and performance of organisms exposed to xenobiotics (Sunila, 1987).

Among the main target organs used to examine the effects of pollutants in mollusks, gills are considered adequate for ecological assessments due to their large surface area in contact with the surrounding water contaminated by xenobiotics (Bigas et al., 2001). In general, gill filaments of bivalve mollusks consist of epithelial and endothelial cells, and mucocytes (David et al., 2008b; Sunila, 1986). The morphology of gill filaments allows this organ to play different roles, such as respiration, transport of food particles and formation of a protective and lubricant layer of mucus on the epithelial surface (Dufour and Beninger, 2001; Gómez-Mendikute et al., 2005).

Therefore, this study was aimed at examining the histology, histochemistry, and ultrastructure of the gill filaments of the Brazilian endemic species *D. expansus*, which occurs in areas of intense agricultural activity in southeast Brazil, after acute exposure to the herbicide atrazine in environmentally realistic exposure concentrations.

2. Material and methods

2.1 Tested compound

Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is a selective herbicide of the triazine group. This herbicide is classified as moderately toxic to humans (class III) and highly hazardous for the environment (class II). The concentrated suspension of the commercial product Atrazine Nortox 500 SC[®] is used in the control of weeds for pre-emergent and early post-emergent applications in corn, sugarcane and sorghum crops.

2.2 Collection of animals

Specimens of *D. expansus* (average body weight $\pm$ SD = 14.15g $\pm$ 7.8; average shell length $\pm$ DP= 4.29cm $\pm$ 0.84) were collected in April 2010 in Ribeirão Claro, municipality of Rio Claro (S 22°24'33.1''; O 47°32'25.1''), São Paulo, Brazil. In order to ensure low contamination levels at the collection site, water samples were collected according to CETESB (1987) and COGERH (2001) and metal and pesticide levels were quantified.

In the laboratory, animals were acclimated for three days in 30-L aquaria filled with water from an artesian well at 25° C, constant aeration and 12-h photoperiod. This procedure was used to minimize stress caused by collection procedures and transport of animals.

2.3 Chemical analysis

After collection, water samples were transported in coolers with reusable ice packs to TASQA Serviços Analíticos Ltda. (Paulínia, São Paulo, Brazil), where chemical analysis were carried out.

Organic parameters (atrazine, glyphosate, 2,4-D) and inorganic compounds (aluminum, total cadmium, total lead, dissolved copper, dissolved iron, total manganese, total nickel, total silver, total zinc) established by the National Environment Council (Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, 2005) were used to evaluate the quality of water samples.

Residues of atrazine and 2,4-D were quantified by the concentration of semivolatile organic compounds with the EPA 8270D method. For glyphosate, the EPA 547 method was used.

The concentration of metals in water samples was obtained based on the quantification of elements by atomic emission spectrophotometry in inductively coupled argon plasma in aqueous extract, according to the SM21 3120B method, similar to the EPA 6010B quantification method, after acid digestion in closed system using microwave heating, following EPA 3015 for liquid samples and EPA 3052 for solid samples.

The concentrations of metals and pesticides in water samples from the collection site were compared with the maximum values allowed for freshwater bodies reported by the National Environment Council (CONAMA, 2005). Freshwater in the Brazilian territory is classified based on the quality required for a given use. In this study, class I and II levels, for human consumption and protection of aquatic communities, were used.

The water quality patterns determined by the National Environment Council (CONAMA, 2005) establish individual limits for each compound in each class and the maximum concentrations allowed. Concentrations above the limits indicate compromised water quality for its corresponding uses.

2.4 Bioassay design

Six 10-L aquaria were used: one aquarium as the control group containing water from an artesian well and five aquaria containing different concentrations of atrazine (2, 6.25, 12.5, 25 and 50 µg/L) obtained by diluting a stock solution (0.5g/L) in water. The highest concentration tested (50 µg/L) is twice that indicated for agricultural use, while the lowest concentration (2 µg/L) is the maximum allowed in freshwater bodies by Brazilian laws

according to the CONAMA resolution 357 (2005). These concentrations were used to evaluate the effects of indiscriminate use of pesticides and the effect of dilution of atrazine in water bodies, similar to environmentally realistic concentrations. The bioassays were as follows:

Control: 8L of artesian well water

Treatment 1: 8L of artesian well water + 16 µg of atrazine (2 µg/L)

Treatment 2: 8L of artesian well water + 50 µg of atrazine (6.25 µg/L)

Treatment 3: 8L of artesian well water + 100 µg of atrazine (12.5 µg/L)

Treatment 4: 8L of artesian well water + 200 µg of atrazine (25 µg/L)

Treatment 5: 8L of artesian well water + 400 µg of atrazine (50 µg/L)

The water in aquaria was aerated continuously by an air pump. After acclimation, five animals were randomly distributed per aquarium. Animals were exposed for seven days in order to evaluate an acute response. This time of exposure has been used in previous studies with atrazine and freshwater bivalves (Jacomini et al., 2006; Zupan and Kalafatic, 2003).

The experimental conditions consisted of a semi-static system with 100% of the volume changed every 24 hours, followed by addition of a freshly prepared stock solution of atrazine with distilled water, to maintain the concentration of the herbicide. The temperature was maintained between 23 – 25°C during the exposure period.

After seven days of exposure, mollusks were anesthetized by thermal shock and small fragments of gills were removed and fixed.

2.5 Histology and histochemistry

The material was fixed in aqueous Bouin solution for 24 hours; immersed in a sodium phosphate buffer solution (pH=7) and maintained in the refrigerator. Samples were then dehydrated in a crescent series of ethanol (70, 80, 90 and 95%,) for 20 minutes each bath, and processed for inclusion in historesin.

Blocs were sectioned at 5 µm with a Leica RM 2245 microtome and glass knives. Sections were hydrated in histological bath and placed in slides. After drying, sections were stained with Harris hematoxylin for 10 minutes and rinsed under tap water for 5 minutes, stained with aqueous eosin for 5 minutes and rinsed with water. After drying, slides were mounted with Canada balsam.

Histochemical methods were carried out to detect the presence of the following compounds: total proteins – bromophenol blue (Pearse, 1985), and polysaccharides –

simultaneously staining with PAS (periodic acid - Schiff) and Alcian blue (Junqueira and Junqueira, 1983). Slides were mounted with Canada balsam, dried and examined under a light microscope.

2.6 Ultrastructure

Small gill fragments were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4°C, rinsed with sodium cacodylate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 2 hours. The material was rinsed once more with the same buffer, immersed in 10% ethanol for 15 minutes and contrasted with 2% uranyl acetate in 10% ethanol for 4 hours. The samples were then dehydrated in a crescent series of acetone, immersed in resin:acetone solution (1:1) for 12 hours, embedded in Epon-araldite resin with catalyzer for 24 hours and maintained in an oven at 70°C for 24 h for resin polymerization. The material was sectioned with an ultramicrotome, sections were placed on copper screen and contrasted with uranyl acetate and lead citrate for later examination under electron transmission microscope Philips CM 100, operated at 80 kV.

2.7 Statistical analysis

Hemocytes infiltrated in the epithelium and mucocytes were counted in 50 gill filaments per individual (5 individuals for each bioassay). Mucocytes were classified as intact or damaged.

The results were statistically analyzed using analysis of variance (ANOVA) with the software SYSTAT 11. Normality was verified previously with the a priori Shapiro-Wilk test (SW) with significance set at $p > 0.05$.

3. Results

3.1 Water analysis

The concentrations of inorganic compounds, dissolved aluminum, dissolved iron and total manganese were lower than the maximum allowed by Brazilian laws for freshwater classes I and II (CONAMA, 2005).

However, the concentrations of all organic compounds and the remaining inorganic parameters (total cadmium, total lead, dissolved copper, total nickel, total silver, and total zinc) could not be determined accurately, as they were below the limits of quantification (LQ) for the method used (Table 1).

The general chemical analysis indicated that the water from the collection site is adequate for the conservation of aquatic communities and human consumption after treatment, as determined for freshwater class I and II (CONAMA, 2005). Therefore, animals collected were not exposed to polluted water.

3.2 Histology and histochemistry

3.2.1 Control group

All animals of the control group survived the seven-day experiment and their gill filaments exhibited intact cells and other associated structures. As described for other eulamellibranch bivalves, gill filaments were united by tissue connections termed interfilamentar and interlamellar junctions. The interfilamentar junctions unite adjacent gill filaments while interlamellar junctions are located in the interlamellar space (Fig. 1A). Occasional pores termed ostia were observed connecting the interlamellar space and the external environment (* in Fig. 1A, B).

The gill filaments of the bivalve *D. expansus* consist of a single layer of different cell types (ciliated and nonciliated cells and mucocytes) and endothelial cells that line them internally. The frontal zone of gill filaments comprises cells with cilia termed frontal, latero-frontal, and lateral cilia. Still in this zone, nonciliated absorptive cells, termed postlateral-frontal cells, are present. The intermediary zone consists of absorptive nonciliated cells with flattened nuclei, gradually resembling squamous cells toward the abfrontal zone. In the abfrontal zone, ciliated and nonciliated cells are present (Fig. 1B).

Supporting structures of gill filaments, termed skeletal loop and skeletal rod are also observed. The skeletal loop extends from the frontal to the intermediary zone (Fig. 1B) and is weakly stained for neutral polysaccharides (Fig. 1C) and proteins (Fig. 1E). The skeletal rod is found in the intermediary zone and is strongly stained for neutral polysaccharides (Fig. 1C, D) but negative for proteins (Fig. 1E).

Mucocytes were observed in intermediary (Fig. 1C) and abfrontal (Fig. 1D) zones. Hemocytes moderately stained for neutral polysaccharides and proteins moved freely in the hemolymph vessels and rarely infiltrated the gill filament epithelium (Fig. 1C).

3.2.2 Exposed groups

All animals exposed to different concentrations of atrazine survived the seven-day experiments. All concentrations of atrazine induced histopathological alterations in the gill

filaments of the bivalve *D. expansus*. Alterations were observed in the frontal and intermediary zones of gill filaments, and were more severe and frequent in animals exposed to higher concentrations of the herbicide (treatments 4 and 5) and less severe and rare in those exposed to lower concentrations (treatments 1, 2 and 3).

In individuals of treatment 1, epithelial adherence (* in Fig. 2A) and lateral fusion of gill filaments (Fig. 2B, C) were observed. Individuals of treatment 2 and 3 exhibited epithelial detachment in the intermediary zone (black arrows in Fig. 2D, E) and dilation of the intercellular space in the frontal zone (white arrows in Fig. 2E) of gill filaments.

Edemas were present in the frontal zone of gill filaments of individuals of treatment 4 (white arrows in Fig. 3A). In the intermediary region of gill filaments of these individuals, epithelial detachment (black arrows in Fig. 3B, C) was observed, as well as gill filaments with total loss of integrity.

In individuals of treatment 5, edemas and epithelial flattening associated with loss of cilia (* in Fig. 3D, F, G) were found in the frontal zone of different gill filaments. The intermediary zone exhibited ruptured mucocytes (Fig. 3G) and epithelial detachment (black arrows in Fig. 3D, F). Hemocytes infiltrating the epithelium were observed in the frontal (Fig. 3E, F) and intermediary zones (Fig. 3D), resulting in deformed filaments. Gill filaments with total loss of integrity (Fig. 3H) were also found in this treatment group.

The histopathological alterations and their frequency in each treatment group are presented in Table 2. In the histochemical analysis, the gill filaments of animals exposed exhibited the same pattern described for the control group.

3.3 Ultrastructure

3.3.1 Control group

The ultrastructural analysis revealed microvilli on the free surface of the epithelial cells that comprise the gill filaments of the bivalve *D. expansus* (Fig. 4A, G). Epithelial cells were united by junction complex formed by adherens and septate junctions (Figs. 4H, I).

In the frontal zone, frontal cells exhibited well-developed golgi apparatus and electron-lucent mitochondria located mainly near basal bodies, where cilia were inserted (Fig. 4A). A few electron-dense vesicles were dispersed in the cytosol (Fig. 4B).

In the apical domain of latero-frontal cells, cilia (black arrows in Fig. 4C) were attached at the basal bodies and arranged in a system of rootlets (white arrows in Fig. 4C).

Ciliary rootlets exhibited striated structures that extended from the basal body until the basal domain of cells.

The postlateral-frontal cells exhibited well-developed endoplasmic reticulum and golgi complex, and few electron-dense vesicles dispersed in the cytosol (Fig. 4D). Several mitochondria were observed in electron dense lateral cells (Fig. 4E). The cytosol of mucocytes present in the intermediary and abfrontal zones was filled by electron-lucent secretion vesicles (Fig. 4F, J).

3.3.2 Treatment groups

The cells and other structures comprising the gill filaments of animals of treatment 1 remained intact. In the frontal cells of individuals of treatments 2 and 3, autophagic vacuoles and electron-dense vesicles, located mainly in the apical domain, were more abundant. Cell junctions remained intact (Fig. 5A).

In treatment 4, edemas were observed in the frontal (Fig. 5B-D) and intermediary (fig. 5E) zones of the gill filament. The decrease in the contact of frontal cells with the skeletal loop, due to the formation of edemas, might have facilitated the infiltration of hemocytes (Fig. 5B). Mitochondria were abundant near the free surface of mucocytes (Fig. 5F).

In treatment 5, cells of the frontal zone of the gill filament exhibited electron-dense cytoplasm (Fig. 6A). Vacuoles were observed in the cytosol of latero-frontal cells (Fig. 6B). Edemas were found in the intermediary zone of filaments (Fig. 6C, D). The plasmatic membrane of mucocytes lost their integrity in the intermediary (Figs. 6D, E) and abfrontal zones (Fig. 6F).

3.4. Statistical analysis

The number of hemocytes infiltrated in the epithelium and mucocytes exhibited a normal distribution ($p > 0.05$). Therefore the parametric test ANOVA was applied. No significant differences were found regarding the number of mucocytes ($R^2 = 0.077$; GL= 5; $p = 0.907$), number of ruptured mucocytes ($R^2 = 0.323$; GL= 5; $p = 0.182$) and number of infiltrated hemocytes in the gill filament epithelium ($R^2 = 0.535$; GL= 5; $p = 0.011$) between the control and treatment groups.

The average number of mucocytes found in animals of treatment 5 was 1.14 times higher than that of the control group (Table 3). The highest averages of ruptured mucocytes (Table 3) and infiltrated hemocytes (table 4) were obtained in animals of treatments 4 and 5.

4. Discussion

The exposure of the bivalve *D. expansus* to atrazine induced significant alterations in the morphology of the gill filaments. The level and frequency of damage was dose dependent. Lower concentrations of the herbicides caused few morphological changes, while higher concentrations resulted in extensive altered areas of the gill filaments of *D. expansus*. Similar results were obtained by Yang et al. (2010) based on a morphological analysis of gills of the fish *Gobiocypris rarus* exposed to environmentally relevant concentrations of this herbicide. According to these authors, the lesions were more severe as the concentration of atrazine increased, with histopathological alterations found in individuals exposed to concentrations equal or above 10 µg/L.

The exposure to environmental pollutants can induce two main types of alterations at the tissue and cell level: changes that indicate damage and those that show the presence and action of protection or defense mechanisms (Parashar and Banerjee, 2002; Triebskorn et al., 1996). Defense mechanisms require considerable amounts of energy to be continuously active. Thus, responses associated to higher energy use are also observed under environmentally stressful conditions (Triebskorn et al., 1996).

Alterations indicating damage were characterized by epithelial detachment, dilation of the intercellular space, edemas, cytoplasmic condensation and vacuolation. The main defense alterations observed were filament fusion, infiltration of hemocytes in the epithelium, and increase in the number of autophagic vacuoles. The response associated to energy use was the increase in mitochondria in mucocytes.

The fusion of gill filaments has been reported in bivalve mollusks exposed to toxic agents (Akaishi et al., 2007; Domouhtsidou and Dimitriadis, 2000; Sunila, 1986, 1987). The corresponding response in fish is the fusion of secondary lamellae, commonly observed in individuals exposed to different pollutants, including the herbicide atrazine (Olurin et al., 2006; Yang et al., 2011; Yasser and Naser, 2011).

Filament fusion can occur in the intermediary and abfrontal zones of gill filaments of bivalve mollusks. Filament fusion in the intermediary zone is usually termed lateral fusion (Domouhtsidou and Dimitriadis, 2000) while that located in the abfrontal zone is termed lamellar fusion (Akaishi et al., 2007; Sunila, 1986). In bivalve mollusks, some authors believe that this alteration is the result of errors during the regeneration of the gill epithelium (Akaishi et al., 2007; Sunila, 1986).

In the present study, the lateral fusion of gill filaments probably occurred due to the increase in epithelial adherence. These responses are associated with the attempt to reduce the surface area between the epithelium of gill filaments and the toxic agent in the water.

The fusion of gill filaments, however, also decreases the surface area for gas exchanges and changes the number and arrangement of cilia. Thus, if this morphological change becomes more extensive, respiration and food uptake may be compromised, negatively influencing the health, survivor, and growth of animals.

In invertebrates, hemocytes play an important role in the defense of the organism through several processes, such as inflammation. The number of these specialized cells may increase in tissues damaged after exposure to a toxic agent (Perez and Fontanetti, 2011), acting in the removal of toxins (Souza and Fontanetti, 2011) and the reabsorption of the damaged epithelium (David et al., 2008a). Hemocytes can leave the hemolymph vessels and infiltrate in different organs, as observed in the gill filaments of bivalve mollusks (Akaishi et al., 2007; David et al., 2008a) and the midgut of diplopods (Godoy and Fontanetti, 2010; Nogarol and Fontanetti, 2010; Souza and Fontanetti, 2011).

In the present study, the number of hemocytes infiltrated in the gill filaments of control animals was not significantly different than those found in animals exposed to atrazine. However, the highest averages of hemocytes infiltrated were observed in the animals exposed to the highest concentrations of atrazine. The infiltration of hemocytes in these animals usually occurred associated to the presence of edemas. According to Bernet et al. (1999), inflammatory reactions are frequency associated to edemas, which explains the correlation of these responses in animals exposed to higher concentrations of this herbicide.

In bivalve mollusks, the increase in mucus secretion is a very common response to the exposure to a toxic agent (David and Fontanetti, 2005, 2009; Nogarol et al., 2011). This response is usually associated to protection or defense mechanisms, as mucus might dilute toxins (Triebkorn et al., 1996), thus removing toxic agents previously absorbed (Sze and Lee, 1995) and creating a barrier to prevent the entrance of toxic agents in damaged cells (David et al., 2008a).

David and Fontanetti (2009) examined whether the number of mucus cells could be used as an efficient pollution biomarker in estuarine bivalves. These authors observed that the number of cells secreting mucus increased according to the level of pollution at the site of collection of animals. Animals from more heavily impacted sites of the Santos Estuary (São Paulo, Brazil) exhibited more mucus cells in the gill filaments. Gregory et al. (2002) also reported an increase in the number of mucocytes in the abfrontal region of gill filaments of

bivalves after 16 days of exposure to mercury. After the recovery period, cells returned to pre-exposure levels.

In the present study, no significant differences were found in the number of mucocytes between the control and treatment groups. However, dense layers of mucus were observed in the surface of gill filaments of the individuals exposed to higher concentrations of atrazine (Nogarol et al., 2011). Thus, the increase in mucus on the surface of gill filaments of the study species is not associated to the number or integrity of mucocytes. Mucus-producing cells might be hyperactive in order to produce higher amounts of mucus to protect gill filaments. This hyperactivity requires higher levels of energy, which explains the presence of more mitochondria in mucocytes.

The increase in mucus secretion is an energetically expensive defense mechanism, but it is essential to limit cell damage (Triebkorn et al., 1996). When chronically exposed to higher concentrations of atrazine, animals need to maintain these mechanisms active continuously in order to survive. Thus, other important processes such as growth and reproduction might be compromised in the long term, as they also require high amounts of energy.

The increase in autophagic vacuoles and electron-dense vesicles was a very evident response in frontal cells of animals exposed to lower concentrations of atrazine. Autophagic vacuoles present in the cytosol of cells acted in the degradation and recycling of old or damaged cell components (Azeredo-Oliveira and Carvalho, 2007; Ianella and Itoyama, 2006). Therefore, higher quantities of autophagic vacuoles might indicate the presence of many organelles damaged by the action of the herbicide. In the attempt to maintain viability, the cell isolates damaged components and initiates the process of intracellular digestion. However, some cell remnants from these vacuoles might not be completely digested, such as lipofuscin granules (Kumar et al., 1994).

Therefore, the electron-dense granules frequently found in the cytosol of these cells might be lipofuscin granules. Lipofuscin is a by-product of the oxidative attack to proteins and lipids and can accumulate in lysosomes (Moore et al., 2006). Some authors describe these granules as participants of detoxification mechanisms, as metal binding sites (Domouhtsidou and Dimitriadis, 2000; George, 1983; Viarengo and Nott, 1993). As a result, the increase in the number of lipofuscin granules in different tissues of bivalve mollusks has been used as a stress biomarker (Akaishi et al., 2007; Zorita et al., 2006).

In some cases, such as exposure to higher concentrations of toxic agents, defense mechanisms are insufficient to maintain the integrity of cells and tissues, resulting in responses indicating damage.

One of these responses found in the epithelial cells that comprise the gill filaments of the bivalve *D. expansus* was the dilation of the intercellular space. The same response was observed in the gill filaments of bivalves exposed to mercury (Bigas et al., 2001) and in the midgut epithelium of diplopods exposed to soil contaminated with metals and polycyclic hydrocarbons (Souza and Fontanetti, 2011).

Kumar et al. (1994) reported that intercellular space dilation is associated to modifications in the plasmatic membrane as a result of the loss of stability of junction complexes. However, in animals from treatments 2 and 3, the ultrastructure analysis indicated that cell junctions were intact.

Sunila (1988) exposed the bivalve *Mytilus edulis* to different environmental pollutants such as metals and pesticides. The organic toxic agents induced shrinkage and separation of the plasmatic membrane of cells of gill filaments. Thus, intercellular space dilation in animals exposed to atrazine might be a consequence of cell atrophy. This was supported by the increased number of autophagic vacuoles in the cytosol of these cells, as previously described, which is frequently observed in cells undergoing atrophy (Kumar et al., 1994).

Edemas were present in the frontal and intermediary zones of gill filaments exposed to higher concentrations of atrazine. The term edema is defined as the accumulation of abnormal quantities of liquid in the intercellular spaces of the tissue (Kumar et al., 1996), due to circulatory disturbances (Bernet et al., 1999). This alteration has been observed in gill filaments of bivalves exposed to metals (Gregory et al., 2002) and gills of fish exposed to atrazine (Jayachandran and Pugazhendy, 2009; Yang et al., 2010).

The presence of edemas in fish is of minor relevance, since the lesion is easily reverted after the exposure to the toxic agent (Bernet et al., 1999). Apparently edemas are also easily reversible in bivalve mollusks. However, further studies are needed to examine the resilience of different bivalve species to exposure to various toxic agents.

Cytoplasmic condensation was also observed in animals exposed to higher concentrations of atrazine. A similar response was also reported for the midgut of diplopods (Triebkorn et al., 1991) and the hepatopancreas of isopods (Köhler et al., 1996) after exposure to different metals. This response is usually accompanied by a reduction in the number of organelles and changes in cell osmolarity (Köhler et al., 1996), and may result in a

decrease in cell volume and consequently dilation of the intercellular space (Triebkorn et al., 1991).

In the present study, latero-frontal cells exhibited condensed cytoplasm with vacuoles. These responses indicate that these cells sustained irreversible damage and are undergoing cell death. Cytoplasmic vacuolation is a typical response of necrotic cells after severe stress, such as the exposure to a toxic agent (Mello and Castilho, 2007). Cytoplasm condensation suggests that the cytoplasmic components may be damaged and non-viable.

The filtering of particles present in the circulating water is one of the main roles of latero-frontal cells (Gregory et al., 2002). These cells exhibit specialized cilia that act as nets to capture food particles (Silverman et al., 1996). Therefore, damage to these cells can decrease the filtering rate and consequently food intake, as observed for the mollusk *Perna perna* exposed to mercury for two days (Gregory et al., 2002).

The flattening of frontal cells and loss of cilia were observed in animals exposed to the highest concentration of atrazine. The exposure to mercury for two and four days induced similar responses in the bivalve *P. perna* (Gregory et al., 2002). The authors reported that throughout the days of exposure, alterations became less frequent and after the recovery period, were no longer observed.

Nogarol et al. (2011) observed disorganization and loss of frontal cilia of gill filaments of *D. expansus* exposed to the same conditions described in the present study. These authors suggested a higher sensitivity of frontal ciliated cells, as confirmed in our study by the observation of flat frontal cells and edemas.

The detachment of the epithelium occurred in the intermediary surface of gills of animals exposed to different concentrations of atrazine, more frequently in individuals exposed to higher concentrations. This response was observed in different areas of gill filaments of bivalve mollusks to different environmental contaminants (David et al., 2008a; Domouhtsidou and Dimitriadis, 2004; Sunila, 1988). In fishes, the detachment of the gill epithelium is considered a regressive alteration, thus indicating a functional reduction of the organ (Bernet et al., 1999). Because of the respiratory role of cells present in the intermediary surface of the filament, gas exchanges might be compromised as well as the health of animals especially those exposed to higher concentrations of atrazine.

5. Conclusions

Our findings clearly indicate that sublethal concentrations of atrazine have adverse effects on the gill filaments of the study species. This herbicide apparently induces dose-dependent alterations. Some of these alterations might result in severe functional impairment, compromising the health and performance of animals exposed for long periods to this herbicide.

Acknowledgments

This study was conducted with financial support of FAPESP (The State of São Paulo Research Foundation), Grant number 2009/12489-9. The authors thank. Dr. Wagner Eustáquio Paiva Avelar and Dr. Cláudia Tasso Callil for the identification of species, Mônica Iamonte, Antonio Teruyoshi Yabuki and Gerson Mello de Souza for technical support, Marcos Perdiza for assistance in the collection of animals, Dr. Tamaris Gimenez Pinheiro for assistance with statistical analysis, the biologists Raphael Bastão de Souza, Ana Claudia de Castro Marcato and Dr. Cintya Aparecida Christofolletti for assistance during experiments.

References

- Abessa, D.M.S., Zaroni, L.P., Sousa, E.C.P.M., Garparro, M.R., Pereira, C.D.S., Rachid, B.R.F., Depledge, M., King, R.S., 2005. Physiological and cellular responses in two population of the mussel *Perna perna* collected at different sites from the coast of São Paulo, Brazil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 217-225.
- Akaishi, F.M., St-Jean, S.D., Bishay, F., Clarke, J., Rabitto, I.S., Ribeiro, C.A.O., 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology* 82, 1-14.
- Armas, E.D., Monteiro, R.T.R., Amâncio, A. V., Correa, R.M.L., Guercio, M.A., 2005. O uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Quim. Nova* 28, 975-982.

Azeredo-Oliveira, M.T.V., Carvalho, H. F., 2007. Lisossomos, in: Carvalho, H. F., Recco-Pimentel, S.M. (Eds.), A Célula. Ed. Manole, Barueri, pp. 199-210.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. Fish Dis. 22, 25–34.

Bigas, M., Durfort, M., Poquet, M., 2001. Cytological effects of experimental exposure to Hg on the gill epithelium of the European flat oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. Tissue & Cell 33, 178-188.

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 1987. Guia de coleta e preservação de amostras de água. CETESB, São Paulo.

COGERH - Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos, 2001. Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água. Informe técnico n.02. COGERH, Fortaleza.

CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>> Acesso em novembro de 2010.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2005. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. Braz. J. Morphol. Sci. 22, 203-210.

David, J.A.O., Fontanetti, C.S., 2009. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. Water Air Soil Pollut. 200, 1-6.

David, J.A.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008a. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. Micron 39, 1293-1299.

David, J.A.O., Salaroli, R.B., Fontanetti, C.S., 2008b. Fine structure of *Mytella falcata* (Bivalvia) gill filaments. Micron 39, 329-336.

Depledge, M.H., 1998. The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutat. Res.* 399, 109-122.

Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2000. Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 472–478.

Domouhtsidou, G.P., Dimitriadis, V.K., 2004. Lysosomal, tissue and cellular alterations in the gills, palps and intestine of the mussels *Mytilus galloprovincialis*, in relation to pollution. *Mar. Biol.* 145, 109–120.

Dufour, S.C., Beninger, P.G., 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. *Mar. Biol.* 138, 295–309.

Fontanetti, C.S., Chistofolletti, C.A., Pinheiro, T.G., Souza, T.S., Pedro-Escher, J., 2010. Microscopy as a tool in toxicological evaluations, in: Méndez-Vilas, A., Días, J. (Eds.), *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education*. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 1001-1007.

George, S.G., 1983. Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis*. Composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comp. Biochem. Physiol.* 76C, 53-57.

Godoy, J.A.P., Fontanetti, C.S., 2010. Diplopods as bioindicators of soils: analysis of midgut of individuals maintained in substratum containing sewage sludge. *Water Air Soil Pollut.* 210, 389–398.

Gómez-Mendikute, A., Elizondo, M., Venier, P., Cajaraville, M. P., 2005. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. *Cell Tissue Res.* 321, 131-140.

Gregory, M.A., George, R.C., Marshal, D.J., Anandraj, A., McClurg, T.P., 1999. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). *Mar. Pollut. Bull.* 39, 116-121.

Gregory, M.A., Marshal, D.J., George, R.C., Anandraj, A., Cclurg, T.P., 2002. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. Mar. Pollut. Bull. 45, 114-125.

Ianella, P., Itoyama, M. M., 2006. Morte Celular. Rev. Unorp 5, 63–77.

Jacomini, A.E., Bonato, P.S., Avelar, W.E.P., 2003. HPLC method for the analysis of atrazine in freshwater bivalves. J Liq Chrom Relat Tech 26, 1885-1894.

Jacomini, A.E., Avelar, W.E.P., Martinês, A.S., Bonato, P.S., 2006. Bioaccumulation of Atrazine in Freshwater Bivalves *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) and *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 387–391.

Jacomini, A.E., Camargo, P.B., Avelar, W.E.P., Bonato, P.S., 2011. Assessment of Ametryn Contamination in River Water, River Sediment, and Mollusk Bivalves in São Paulo State, Brazil. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60, 452–461.

Jayachandran, K., Pugazhendy, K., 2009. Histopathological Changes in the Gill of *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings Exposed to Atrazine. Am-Euras. J. Sci. Res. 4, 219-221.

Junqueira, L.C., Junqueira, L.M.M.S., 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Livraria Editora Santos, São Paulo.

Köhler, H.R., Hüttenrauch, K., Berkus, M., Gräff, S., Alberti, G., 1996. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. Appl. Soil Ecol. 3, 1–15.

Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L., 1994. Patologia básica, fifth ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Mantecca, P., Vailati, G., Bacchetta, R., 2006. Histological changes and micronucleous inductions in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure. Histol. Histopathol. 21, 829-840.

Mello, M. L. S., Castilho, R.F., 2007. Morte Celular, in: Carvalho, H. F.; Recco-Pimentel, S.M. (Eds.), A Célula. 2. ed. Ed. Manole, Barueri, pp. 364-373.

Moore, M.N., Allen, J.I., Somerfield, P., 2006. Autophagy: role in surviving environmental stress. *Mar. Environ. Res.* 62, 420-425.

Naimo, T.J., 1995. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. *Ecotoxicology* 4, 341-362.

Nogarol, L.R., Fontanetti, C.S., 2010. Acute and subchronic exposure of diplopods to substrate containing sewage mud: Tissular responses of the midgut. *Micron* 41, 239–246.

Nogarol, L.R., Brossi-Garcia, A.L., Fontanetti, C.S., 2011. Surface Morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) Gill Filaments After Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine Herbicide. *Microsc. Res. Tech.* DOI 10.1002/jemt.21130.

Olurin, K.B., Olojo, E.A.A., Mbaka, G.O., Akindele, A.T., 2006. Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide, glyphosate. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 2480-2487.

Parashar, R.S., Banerjee, T.K., 2002. Toxic impact of lethal concentration of lead nitrate on the gills of air-breathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Vet. Arch.* 72, 167–183.

Pearse, A.G.E., 1985. Histochemical: Theoretical and Applied. Churchill 530p.

Peltier, G. L.; Meyer, J.L.; Jagoe, C.H, William, A., Hopkins, W.A., 2008. Using trace element concentrations in *Corbicula fluminea* to identify potential sources of contamination in an urban river. *Environ. Pollut.* 154, 283-290.

Perez, D.G., Fontanetti, C.S., 2011. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. *Environ. Monit. Assess.* 177, 437-447.

Sanches, S.M., Silva, C.H.T.P., Campos, S.X., Vieira, E.M., 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 13, 53-58.

Silverman, H., Lynn, J.W., Dietz, T.H., 1996. Particle capture by the gills of *Dreissena polymorpha*: structure and function of laterofrontal cirri. *Biol. Bull.* 191, 42–54.

Simon, O., Floriani, M., Cavalie, I., Camilleri, V., Adam, C., Gilbin, R., Garnier-Laplace, J., 2011. Internal distribution of uranium and associated genotoxic damages in the chronically exposed bivalve *Corbicula fluminea*. *J. Environ. Radioact.* 102, 766- 773.

Solomon, K.R.; Carr, J. A.; Du Preez, L.H.; Giesy, J. P.; Kendall, R.J; Smith, E. E.; Der Kraak, G.J.V., 2008. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 721–772.

Souza, T.S., Fontanetti, C.S., 2011. Morphological biomarkers in the *Rhinocricus padbergi* midgut exposed to contaminated soil. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 74, 10-18.

Sunila, I., 1986. Chronic histopathological effects of short-term copper and cadmium exposure on the gill of the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.* 47, 125-142.

Sunila, I., 1987. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Ann. Zool. Fennici*, 24, 55-69.

Sunila, I., 1988. Acute Histological Responses of the Gill of the Mussel, *Mytilus edulis*, to Exposure by Environmental Pollutants. *J. Invertebr. Pathol.* 52, 137-141.

Sze, P.W.C., Lee, S.Y. 1995. The Potential Role of Mucus in the Depuration of Copper from the Mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Mar. Pollut. Bull.* 31, 390-393.

Triebskorn, R., Köhler, H.R., Zanh, T., Vogt, G., Ludwig, M., Rumpf, S., Kratzmann, M., Alberti, G., Storch, V., 1991. Invertebrate cells as targets for hazardous substances. *Ziet. Für Angewandte Zool.* 78, 277–287.

Triebskorn, R., Henderson, I. F., Martin, A., Köhler, H. R., 1996. Slugs as targets or non-target organisms for environmental chemicals. Slug & Snail Pests in Agriculture. BCPC Symposium Proceedings, 66, 65–72.

Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 104C, 355-372.

Yang, L., Zha, J., Li, W., Li, Z., Wang, Z., 2010. Atrazine affects kidney and adrenal hormones (AHs) related genes expressions of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). Aquat. Toxicol. 97, 204-211.

Yasser, A.G., Naser, M.D., 2011. Impact of pollutants on fish collected from different parts of Shatt Al-Arab River: a histopathological study. Environ Monit Assess. 181, 175-182.

Zorita, I., Ortiz-Zarragoitia, M., Soto, M., Cajaraville, M.P., 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): an integrated biochemical, histochemical and histological study. Aquat. Toxicol. 78, 109-116.

Zupan, I., Kalafatic, M., 2003. Histological effects of low atrazine contamination on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70, 688-695.

Table 1. Values of organic and inorganic parameters found in water samples from the collecting sites and maximum levels allowed by Brazilian laws (CONAMA, 2005).

Inorganic Parameters	LQ	Sample	CONAMA Resolution 357
Dissolved Aluminum	0.07	0.09	0.10
Total cadmium	0.003	<LQ	0.001
Total lead	0.03	<LQ	0.01
Dissolved copper	0.003	<LQ	0.009
Dissolved iron	0.002	0.2	0.3
Total manganese	0.002	0.08	0.1
Total zinc	0.006	<LQ	0.18
Total nickel	0.005	<LQ	0.025
Total silver	0.003	<LQ	0.01
Organic Parameters	LQ	Sample	CONAMA Resolution 357
Atrazine	15	<LQ	2
2,4-D	2	<LQ	4
Glyphosate	60	<LQ	65

LQ= Limit of quantification. Values in mg/L for inorganic parameters and µg/L for organic parameters.

Table 2. Histopathological alterations in the gill filaments of the bivalve *D. expansus* after acute exposure to the herbicide atrazine.

Effects	Bioassays				
	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4	Treatment 5
Epithelial adhesion	+	-	-	-	-
Filament fusion	+	-	-	-	-
Flattening of the epithelium (FZ)	-	-	-	-	++
Edema	-	-	-	++	+++
Epithelial detachment (IZ)	-	+	++	+++	+++
Dilation of the intercellular space	-	+	++	-	-
Loss of the integrity of the filament	-	-	-	++	+++

- absence of histopathological alterations; + rare alterations; ++ relatively common alterations; +++ alterations frequently observed in extensive areas of gill filaments.

FZ Frontal Zone; IZ Intermediary Zone.

Table 3. Average and standard deviation of total and ruptured mucocytes in the epithelium of 50 gill filaments of *D. expansus* (n=5).

Groups	Mucocytes				Ruptured mucocytes			
	Min	Max	Average	SD	Min	Max	Average	SD
C	44	119	75.5	33.27	7	27	14.5	9
T1	35	126	79.5	42.6	7	24	14.25	7.5
T2	65	82	72	7.16	5	23	10.5	8.38
T3	57	102	76.25	18.9	10	16	13.25	2.75
T4	47	88	64.75	17.72	19	26	22	3.55
T5	69	126	86.75	26.48	11	28	20.75	7.5

SD standard deviation; C control; T1 treatment 1; T2 treatment 2; T3 treatment 3; T4 treatment 4; T5 treatment 5
p<0.05

Table 4. Average and standard deviation of hemocytes infiltrated in the epithelium of 50 gill filaments of *D. expansus* (n=5).

Groups	Infiltrated hemocytes			
	Min	Max	Average	SD
C	19	48	31.25	12.12
T1	43	50	46.75	2.98
T2	35	40	37.75	2.62
T3	30	48	40	8.48
T4	45	64	55	7.78
T5	35	63	49.25	11.61

SD standard deviation; C control; T1 treatment 1; T2 treatment 2; T3 treatment 3; T4 treatment 4; T5 treatment 5

p<0.05

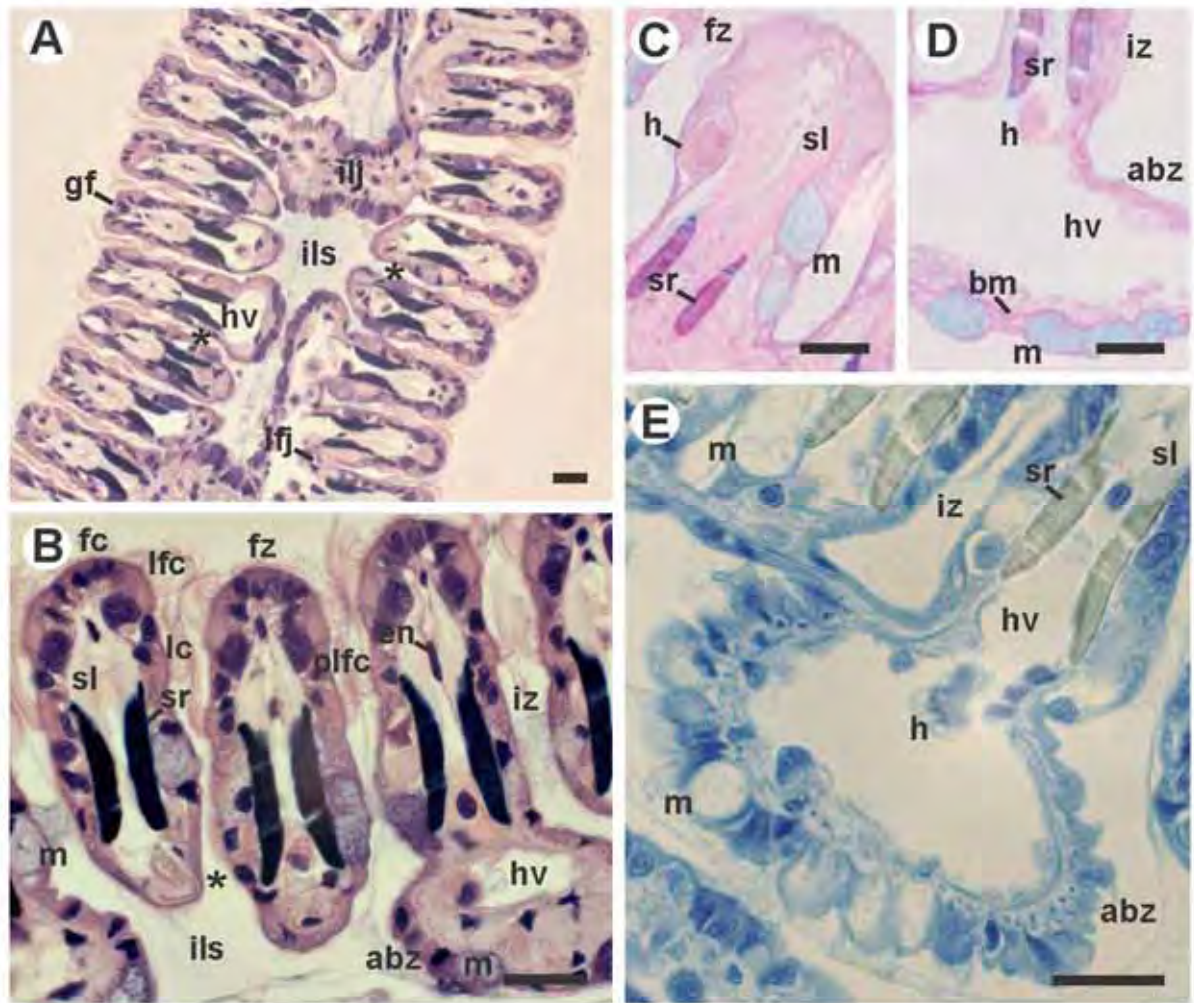


Figure 1. Gill filaments of *D. expansus* stained with hematoxylin and eosin (A; B), simultaneous PAS and Alcian blue (C; D), and bromophenol blue (E). Control group.

gf= gill filament; ifj= interfilamentar junction; ilj= interlamellar junction; hv= hemolymph vessel; ils= interlamellar space; *= ostia; fz= frontal zone; iz= intermediary zone; abz= abfrontal zone; fc= frontal cilia; lfc= latero-frontal cilia; lc= lateral cilia; plfc= post-latero frontal cell; sr= skeletal rod; sl= skeletal loop; m= mucocyte; en= endothelium; bm= basal membrane; h= hemocyte. Scale bars= 20μm.

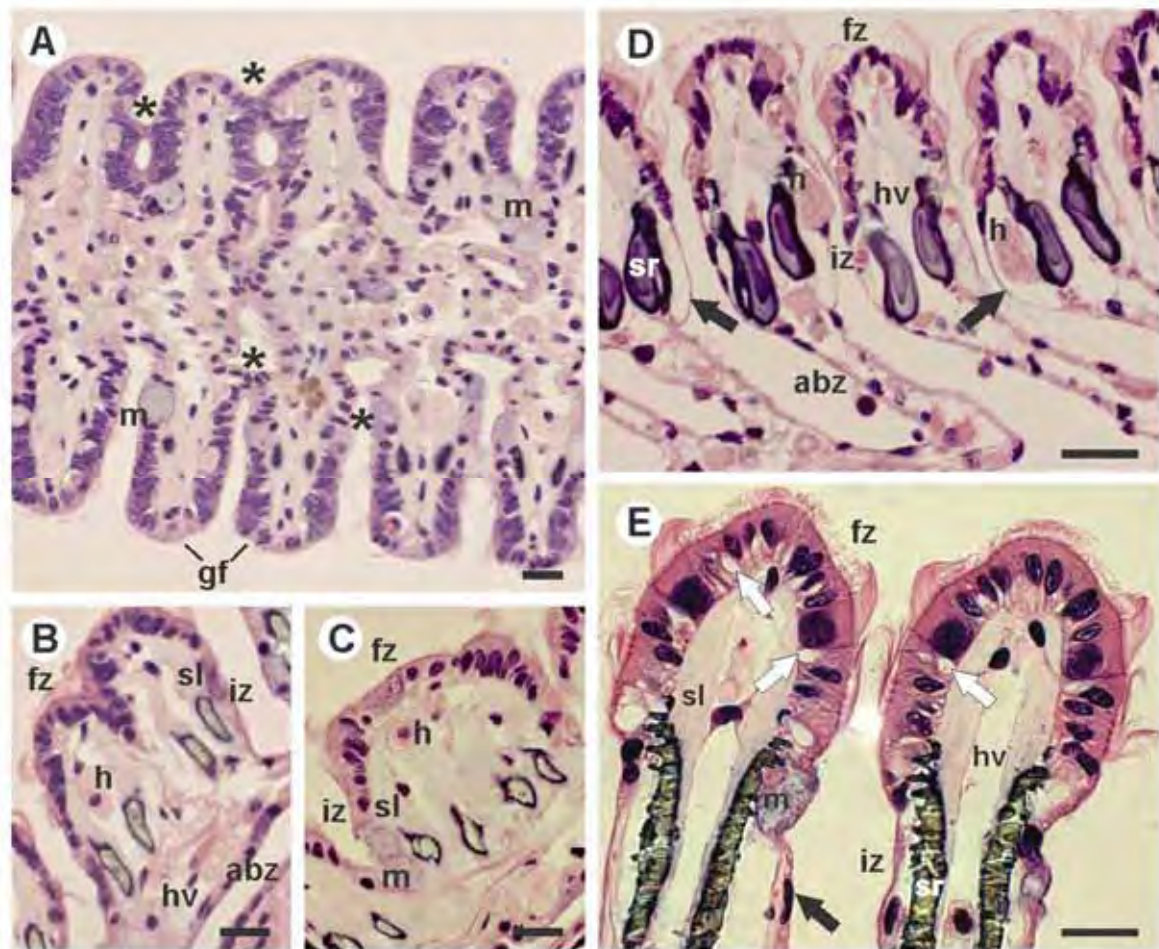


Figure 2. Gill filaments of *D. expansus* stained with hematoxylin and eosin. Treatment 1 (A-C) and treatments 2 and 3 (D; E).

gf= gill filament; m= mucocyte; fz= frontal zone; iz= intermediary zone; abz= abfrontal zone; hv= hemolymph vessel; sr= skeletal rod; sl= skeletal loop; h= hemocyte; *= epithelial adherence; black arrow= epithelial detachment; white arrow= dilation of the intercellular space. Scale bars= 20μm.

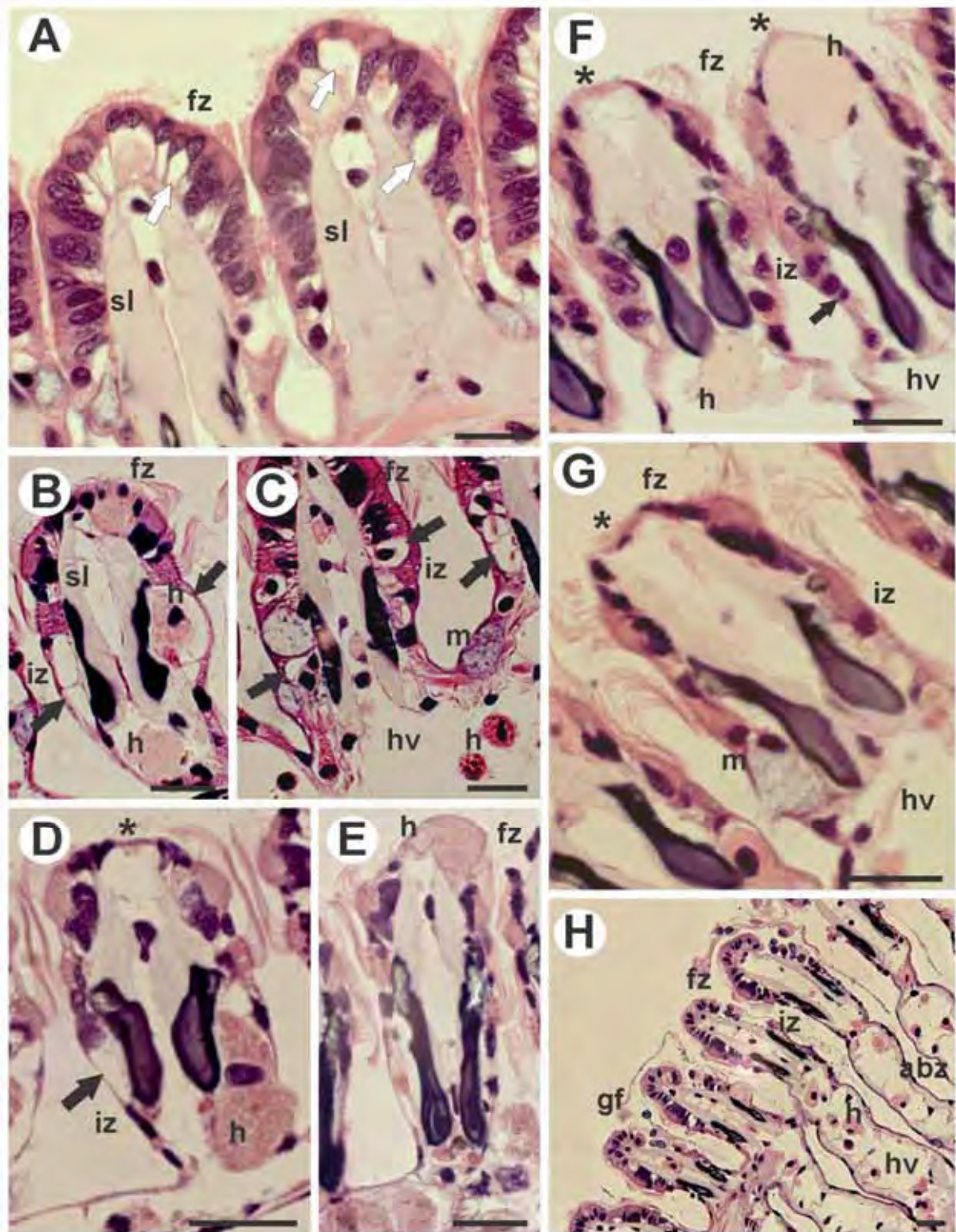


Figure 3. Gill filaments of *D. expansus* stained with hematoxylin and eosin. Treatment 4 (A-C) and 5 (D-H).

fz= frontal zone; iz= intermediary zone; abz= abfrontal zone; sl= skeletal loop; h= hemocyte; hv= hemolymph vessel; m= mucocyte; white arrow= edema; black arrow= epithelial detachment; *= epithelial flattening. Scale bars= 20μm.

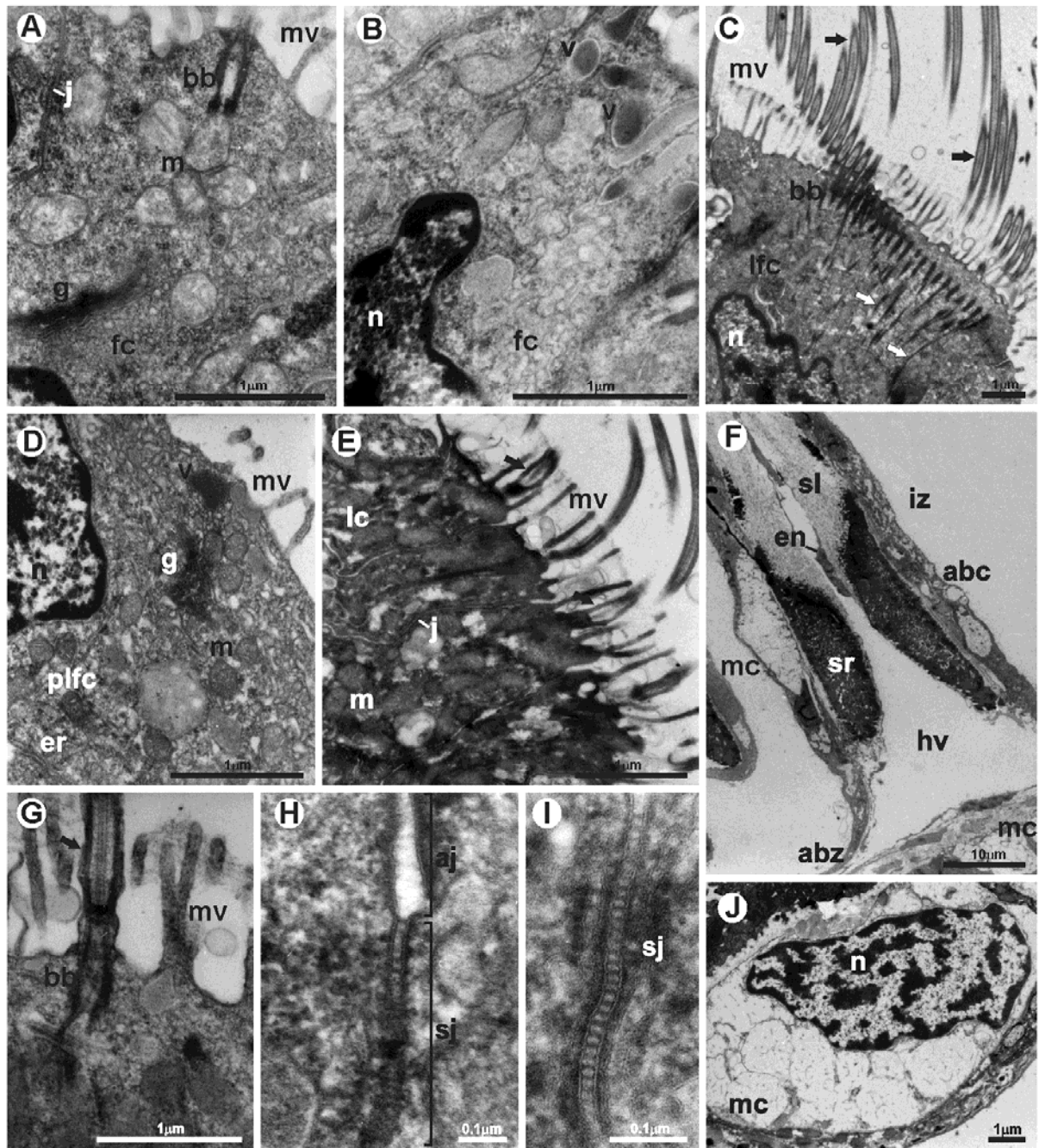


Figure 4. Electron micrographs of cells present in frontal (A-E), intermediary, and abfrontal (F; J) zones of gill filaments of *D. expansus* and detail of microvilli (G) and cell junctions (H; I). Control group.

mv= microvilli; v= vesicle; j= cell junction; aj= adherens junction; sj= septate junction; bb= basal body; n= nucleus; m= mitochondria; er= endoplasmic reticulum; g= golgi complex; fc= frontal cell; lfc= latero-frontal cell; plfc= post-latero frontal cell; lc= lateral cell; abc= absorptive cells; en= endothelium; hv= hemolymph vessel; iz= intermediary zone; abz= abfrontal zone; sl= skeletal loop; sr= skeletal rod; mc= mucocyte; black arrow= cilia; white arrow= rootlets.

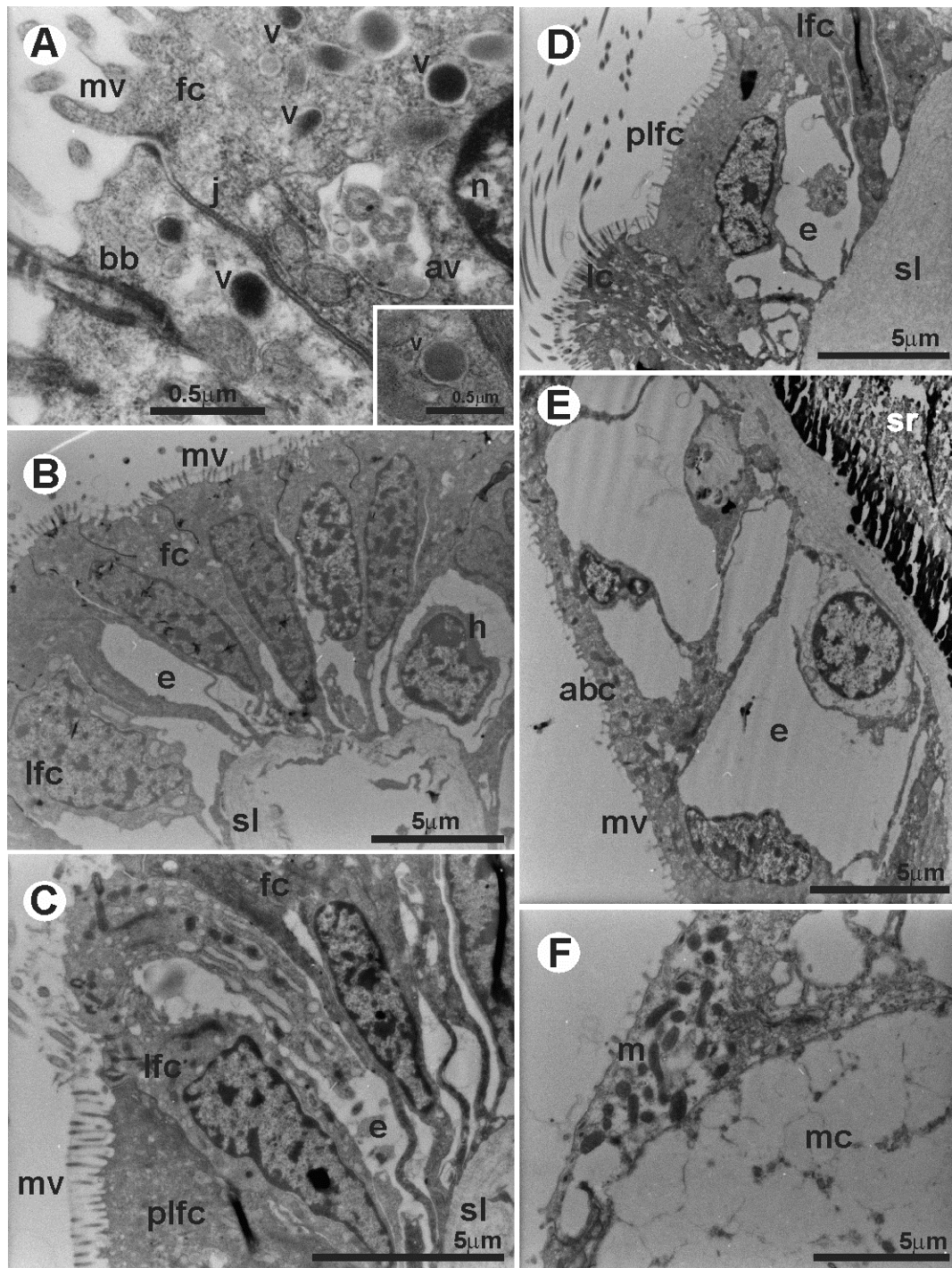


Figure 5. Electron micrographs of cells present in frontal (A-D) and intermediary (E; F) regions of gill filaments of *D. expansus*. Treatments 2 and 3 (A) and 4 (B-F).

mv= microvilli; v= vesicle; j= cell junction; av= autophagic vacuole; bb= basal body; n= nucleus; m= mitochondria; fc= frontal cell; lfc= latero-frontal cell; plfc= post-latero frontal cell; lc= lateral cell; abc= absorptive cells; h= hemocyte; e= edema; sl= skeletal loop.

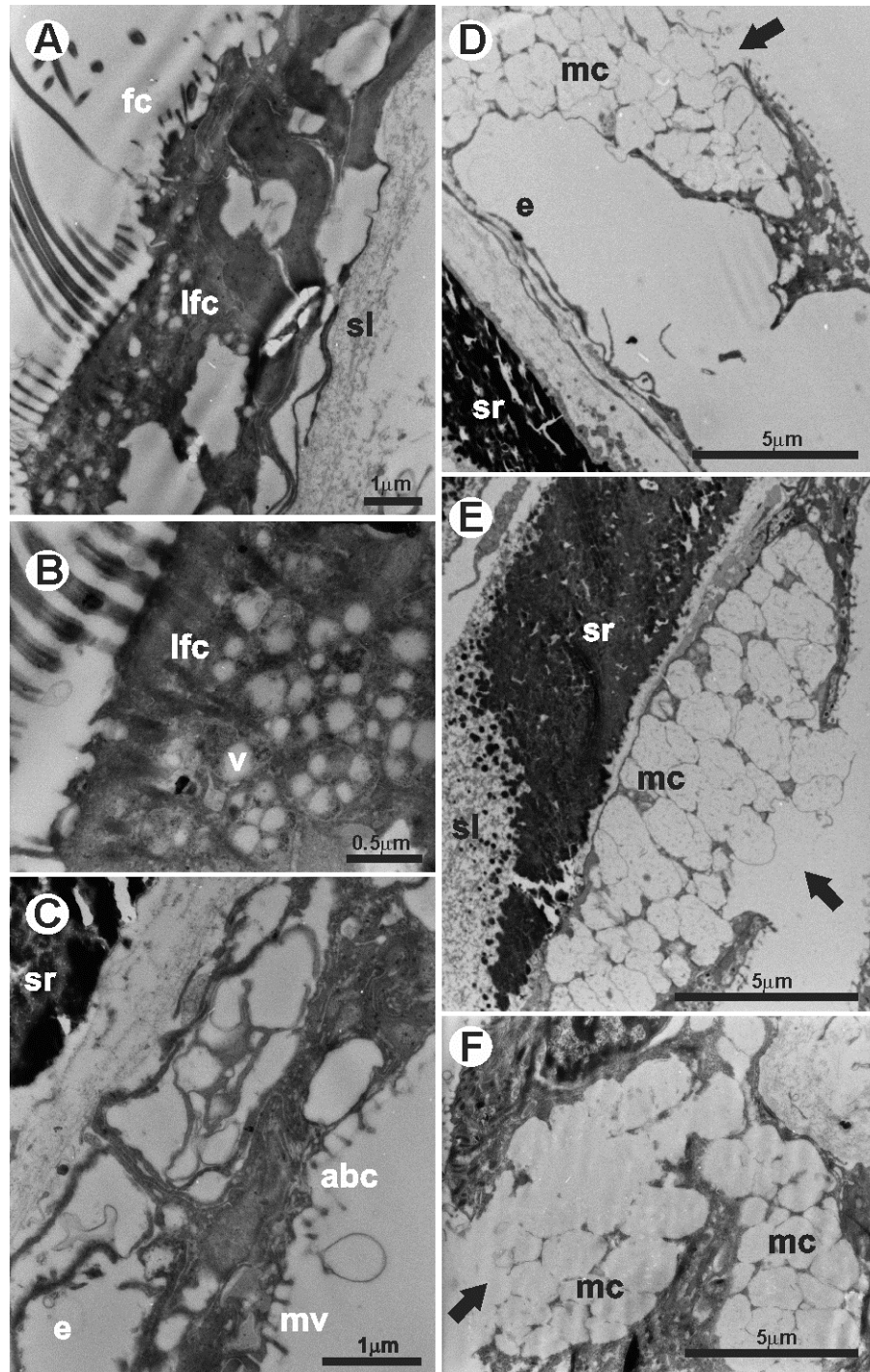


Figure 6. Electron micrographs of cells present in frontal (A; B), intermediary (C-E), and abfrontal (F) regions of gill filaments of *D. expansus*. Treatment 5.

lfc= latero-frontal cell; fc= frontal cell; abc= absorptive cell; mv= microvilli; e= edema; sl= skeletal loop; sr= skeletal rod; v= vacuole; mc= mucocyte; black arrow= ruptured membrane.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a suas características físico-químicas e ampla utilização, o herbicida atrazina é um dos principais contaminantes de águas superficiais e subterrâneas em todo o mundo. Essa é uma problemática enfrentada por muitos países como os Estados Unidos da América e que também tem se agravado no Brasil diante da expansão das culturas agrícolas como, por exemplo, de cana-de-açúcar e milho. Desta forma, torna-se necessário o monitoramento desses ecossistemas que sofrem a influência dessas fontes de contaminação provenientes das atividades agrícolas. A utilização de parâmetros biológicos é fundamental para se avaliar os impactos causados no ecossistema, utilizando-se principalmente representantes da fauna endêmica, como potenciais espécies bioindicadoras. Neste sentido, esse trabalho buscou avaliar os possíveis efeitos tóxicos de concentrações ambientalmente relevantes do herbicida atrazina em um representante da malacofauna endêmica, utilizando-se parâmetros morfológicos sob condições laboratoriais controladas. A partir dos resultados obtidos nesse trabalho foi possível concluir:

- Os filamentos branquiais da espécie estudada apresentam morfologia similar à de outros bivalves eulamelibrânquios. Entretanto, foi observada a presença simultânea de duas estruturas de sustentação especializadas chamadas hastes e alça de sustentação, ainda não descritas detalhadamente na literatura.
- A espécie *D. expansus* mostrou-se sensível para avaliar a toxicidade do herbicida atrazina e, possivelmente, possa ser utilizada para avaliação da qualidade de corpos d'água sob influência de diferentes fontes de poluição.
- As brânquias foram sensíveis à presença do herbicida atrazina. Esse órgão apresentou respostas tissulares relacionadas com proteção ou defesa, ocorrência de danos e maior gasto energético.
- As alterações histopatológicas foram mais diversificadas e frequentes nos animais expostos a maiores concentrações do herbicida, revelando uma resposta dose-dependente;

- A concentração máxima de atrazina permitida em corpo d'água doce pela legislação brasileira não causou alterações histopatológicas significativas no bivalve estudado após exposição aguda. Entretanto, existe a necessidade de se avaliar os efeitos dessa concentração de herbicida em níveis mais baixos da escala biológica, por exemplo, a nível molecular e bioquímico.
- Em corpos d'água próximos a áreas agrícolas, as maiores concentrações de herbicida são usualmente encontradas logo após a aplicação no solo, seguida de chuvas e irrigação. No trabalho realizado, essa situação seria comparável a uma exposição por um curto período (exposição aguda) as maiores concentrações testadas. Essas concentrações causaram alterações histopatológicas significativas nas brânquias dos animais estudados, cuja permanência e extensão comprometeriam o desempenho e saúde dos animais. Desta forma, seria interessante realizar trabalhos futuros que avaliem se essas alterações são reversíveis ou permanentes diante da diminuição das concentrações do herbicida, submetendo os animais a um período de recuperação.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM-GUILLERMIN, C.; FOURNIER, E.; FLORIANI, M.; CAMILLERI, V.; MASSABUAU, G.C.; GARNIER-LAPLACE, J. Biodynamics, Subcellular Partitioning, and Ultrastructural Effects of Organic Selenium in a Freshwater Bivalve. **Environ. Sci. Technol.**, v. 43, p. 2112–2117, 2009.

ARIAS, A.R.L.; BUSS, D.F.; ALBUQUERQUE, C.; INÁCIO, A.F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D.F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p.61-72, 2007.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; AMÂNCIO, A. V.; CORREA, R.M.L.; GUERCIO, M.A. O uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na Bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Quim. Nova**, v. 28, n.6, p. 975-982, 2005.

AUFFRET, M.; OUBELLA, R. Hemocyte aggregation in the oyster *Crassostrea gigas*: in vitro measurement and experimental modulation by xenobiotics. **Comp Biochem Physiol A**, v. 118, p. 705– 712, 1997.

BARŠIENĖ, J.; ANDREIKĖNAITĖ, L.; GARNAGA, G.; RYBAKOVAS, A. Genotoxic and cytotoxic effects in the bivalve mollusks *Macoma balthica* and *Mytilus edulis* from the Baltic Sea. **Ekologija**, v. 54, n.1, p.44–50, 2008.

BASACK, S.B.; ONETO, M.L.; FUCHS, J.S.; WOOD, E.J.; KESTEN, E.M. Esterases of *Corbicula fluminea* as Biomarkers of Exposure to Organophosphorus Pesticides. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 61, p. 569-576, 1998.

BEASLEY, C.R.; TÚRY, E.; VALE, W.G.; TAGLIARO, C.H. Reproductive cycle, management and conservation of *Paxyodon syrmatophorus* (Bivalvia; Hyriidae) from the Tocantins River, Brazil. **J. Moll. Stud.**, v. 66, p. 393-402, 2000.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal of a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish Dis.**, Oxford, v. 22, p. 25-34, 1999.

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

BIGAS, M.; DURFORT, M.; POQUET, M. Cytological effects of experimental exposure to Hg on the gill epithelium of the European flat oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. **Tissue & Cell**, v. 33, n. 2, p. 178-188, 2001.

BIRDSALL, K.; KUKOR, J.J.; CHENEY, M.A. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds by the gills of the bivalve mollusk *Elliptio complanata*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 2, p. 309–316, 2001.

BOENING, D.W. An evaluation of bivalves as biomonitors of heavy metals pollution in marine waters. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 55, p. 459–470, 1999.

BOGAN, A.E. Global diversity of freshwater mussels (Mollusca, Bivalvia) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 139–147, 2008.

BOLDINA-COSQUERIC, I.; AMIARD, J.C.; AMIARD-TRIQUET, C.; DEDOURGE-GEFFARD, O.; MÉTAIS, I.; MOUNEYRAC, C.; MOUTEL, B.; A, BERTHET, B. Biochemical, physiological and behavioural markers in the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* as tools for the assessment of estuarine sediment quality. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1733–1741, 2010.

BOLOGNESI, C.; HAYASHI, M. Micronucleus assay in aquatic animals. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 205–213, 2011.

BONETTO, A.A.; TASSARA, M.P.; RUMI, A. Australis n. subgen. de *Diplodon spix* (Bivalvia, Unionacea) y posibles relaciones con Hyriidae australianos. **Bol. Soc. Biol.**, v.57, 55-61, 1986.

BOTTINI, M.A. Composición y distribución de la asociación de moluscos bentónicos en la laguna La Patagua, Península de Quetrihu, Degree Final Work Report, Centro Regional Universitario Bariloche, Universidade Nacional del Comahue, Argentina. 1993.

BOUILLY, K.; MCCOMBIE, H.; LEITÃO, A.; LAPÉGUE, S. Persistence of atrazine impact on aneuploidy in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. **Marine Biology**, v. 145, p. 699–705, 2004.

BRAINWOOD, M.; BURGIN, S.; BYRNE, M. The role of geomorphology in substratum patch selection by freshwater mussels in the Hawkesbury- Nepean River (New South Wales) Australia. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v.18, p.1285–1301, 2008.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; Anuário Estatístico do Brasil, IBGE: Rio de Janeiro, v.69, 2009.

BYRNE, M. Reproduction of river and lake populations of *Hyridella depressa* (Unionacea: Hyriidae) in New South Wales: implications for their conservation. **Hydrobiologia**, v. 389, p. 29–43, 1998.

BYRNE, M. Calcium concretions in the interstitial tissues of the Australian freshwater mussels *Hyridella depressa* (Hyriidae). In: HARPER, E.M.; TAYLOR, J.D; CRAME, J.A. (Orgs.). **The Evolutionary Biology of the Bivalvia**. London: Geological Society, 2000. p.329-337.

CALLIL, C.T.; MANSUR, M. C. D. Gametogênese e dinâmica da reprodução de *Anodontites trapesialis* (Lamarck) (Unionoida, Mycetopodidae) no lago Baía do Poço, planície de inundação do rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 3., p. 825-840, 2007.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Guia de coleta e preservação de amostras de água. 1ª ed. São Paulo: CETESB, 1987. 155p.

CHENEY, M.A.; KEIL, D.; QIAN, S. Uptake and effect of mercury on amino acid losses from the gills of the bivalve mollusks *Mytilus californianus* and *Anodonta californiensis*. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 320, p. 369–375, 2008.

COADY, K.K.; MURPHY, M.B.; VILLENEUVE, D.L.; HECKER, M.; JONES, P.D.; CARR, J.A.; SOLOMON, K.; SMITH, E.; VAN DER KRAAK, G.; KENDALL, R.J.; GIESY, J.P. Effects of atrazine on metamorphosis, growth, laryngeal and gonadal development, aromatase activity, and sex steroid concentrations in *Xenopus laevis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 62, p.160–173, 2005.

COGERH - Companhia de Gestão dos Recursos Hídricos. Recomendações e cuidados na coleta de amostras de água. Informe técnico n.02. 1ª ed. Fortaleza: COGERH, 2001. 20p.

COLVILLE, A.E.; LIM, R.P. Microscopic structure of the mantle and palps in the freshwater mussels *Velesunio ambiguus* and *Hyridella depressa* (Bivalvia: Hyriidae). **Molluscan Research**, v. 23, p. 1-20, 2003.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente, 2005. Resolução No. 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>> Acesso em novembro de 2010.

CURIAL, O.; LANGE, R.R. Observações sobre a proporção de sexos em *Diplodon deodontus expansus*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 111-112, 1974a.

CURIAL, O.; LANGE, R.R. Hermafroditismo em *Diplodon delotundus expansus*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p. 109-110, 1974b.

CURIAL, O.; LANGE, R.R. Variações histológicas sazonais das gônadas do *Diplodon delodontus expansus* (Küster) (Mollusca, Unionidade). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 18, p. 65-67, 1975.

DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C.S. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, Campinas, v. 22, n. 4, p. 203-210, 2005.

DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C.S. The role of mucus in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gills from polluted environments. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 200, p. 1-6, 2009.

DAVID, J. A. O.; SALAROLI, R. B.; FONTANETTI, C.S. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. **Micron** (Oxford), v. 39, p. 1293-1299, 2008a.

DAVID, J. A. O.; HOSHINA, M.; FONTANETTI, C.S. DNA damages in *Mytella falcata* (Mytiloidea, Mytilidae) cells: a new tool for biomonitoring studies in tropical estuarine ecosystems. **Naturalia** (São José do Rio Preto), v. 31, p. 2, 2008b.

DE GREGORI, I.; DELGADO, D.; PINOCHET, H.; GRAS, N.; MUÑOZ, L.; BRHUN, C. e NAVARRETE, G. Cadmium, lead, copper and mercury levels in fresh and canned bivalve mussels *Tagelus dombeii* (Navajuela) and *Semelle solida* (Almeja) from the Chilean coast. **Sci. Total Environ.**, v.148, p. 1-10, 1994.

DEPLEDGE, M. H. Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. In: BJORNSTAD, E.; HAGERMAN, L.; JENSEN, K. JENSEN, K. **Proceedings of the 21th Baltic Marine biologists Symposium**. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark. 1992.

DEWEY, S.L. Effects of the herbicide atrazine on aquatic insect community structure and emergence. **Ecology**, v. 67, p.148–162, 1986.

DIANA, S.G.; RESETARITS JR. W.J.; SCHAEFFER, D.J.; BECKMEN, K.B.; BEASLEY, V. Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities. **Environ. Toxicol. Chem.**, v.19, p. 2961–2967, 2000.

DOMOUHTSIDOU, G.P.; DIMITRIADIS, V.K. Lysosomal, tissue and cellular alterations in the gills, palps and intestine of the mussels *Mytilus galloprovincialis*, in relation to pollution. **Marine Biology**, v.145, p. 109–120, 2004.

DU PREEZ, H.H., VAN VUREN, J.H.J. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.101C, p.651–655, 1992.

EDWARDS, C. A. **Persistent pesticides in the environment**. 2. ed. U.S.A.: CRC Press, 1973. 170p.

EDWIN, D. O. **Control of water pollution from agriculture**. Irrigation and Drainage, New York, v.55, p. 1-101. 1996.

EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. **U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.** v. 85, p. 1–55, 1989.

FERNÁNDEZ-TAJES, J.; FLÓREZ, F.; PEREIRA, S.; RÁBADE, T.; LAFFON, B.; MÉNDEZ, J. Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. **Environ Monit Assess.**, v. 177, p. 289–300, 2011.

FARRINGTON, J. W. Bivalves as sentinels of coastal chemical pollution: The Mussel (and the oyster) Watch. **Oceans**, v.20, n.2, p.18-29, 1983.

FERREIRA, A.G., MACHADO, A.L.S., ZALMON, I.R. Temporal and Spatial Variation on Heavy Metal Concentrations in the bivalve *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) on the Northern Coast of Rio de Janeiro State, Brazil. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 47, n. 2, p. 319-327, 2004.

FLYNN, K.; SPELLMAN, T. Environmental levels of atrazine decreases patial aggregation in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p.1228– 1233, 2009.

FONTANETTI, C.S.; CHISTOFOLETTI, C.A.; PINHEIRO, T.G.; SOUZA, T.S.; PEDRO-ESCHER, J. Microscopy as a tool in toxicological evaluations. In: MÉNDEZ VILAS, A.; DÍAS, J. (Eds.). **Microscopy: Science, Technology, Applications and Education**. FORMATEX, 2010. p. 1001-1007.

FOSTER, R.B.; BATES, J.M.; Use of freshwater mussels to monitor point source industrial discharges. **Environ. Sci. Technol.**, v. 12, n.8, p. 958-962, 1978.

GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 8.ed. Sunderland: Sinauer Associates Inc., 2006. 817p.

GRAF, D. L. The Etheriidae revisited: a phylogenetic analysis of hyriid relationships (Mollusca: Bivalvia: Paleoheterodonta: Unionoida). Occasional papers of the Museum of Zoology, The University of Michigan Number 729: 1–21. 2000.

GRANEY JR., R.L.; CHERRY, D.S.; CAIRNS JR., J. Heavy metal indicator potential of the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in artificial stream systems. **Hydrobiologia**, v.102, p.81-88, 1983.

GREGORY, M.A.; GEORGE, R.C.; MARSHALL, D.J.; ANANDRAJ, A.; MCCLURG, T.P. The effects of mercury exposure on the surface morphology of gill filaments in *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia). **Mar. Pollut. Bull.**, v. 39, p. 116-121, 1999.

GREGORY, M.A.; MARSHAL, D.J.; GEORGE, R.C.; ANANDRAJ, A.; CCLURG, T.P. Correlations between metal uptake in the soft tissue of *Perna perna* and gill filament pathology after exposure to mercury. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 45, p. 114-125, 2002.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005. 392p.

GUEVARA, S.R., BUBACH, D., VIGLIANO P., LIPPOLT, G., ARRIBÉRE, M. Heavy metal and other trace elements in native mussel *Diplodon chilensis* from Northern Patagonia Lakes, Argentina. **Biological Trace Element Research**, v. 102, p.245-263, 2004.

GUEVARA, S.R.; ARRIBÉRE, M.; BUBACH, D., VIGLIANO P., RIZZO, A., ALONSO, M.; SNACHEZ, R. Silver contamination on abiotic and biotic compartments of Nahuel Huapi National Park lakes, Patagonia, Argentina. **Science of the Total Environment**, v. 336, p. 119-134, 2005.

GUNDACKER, C. Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater mollusks of urban river habitats in Vienna. **Environmental Pollution**, v.110, p. 61-71, 2000.

GUNKEL, G.; STREIT, B. Mechanisms of bioaccumulation of a herbicide (atrazine, S-triazine) in a freshwater mollusk (*Ancylus fluviatilis* Müll.) and a fish (*Coregonus fera* Jurine). **Water Res.**, v.14, p.1573–1584, 1980.

HAYES, T.; COLLINS, A.; LEE, M.; MENDOZA, M.; NORIEGA, N.; STUART, A.; VONK, A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide, atrazine, at low ecologically relevant doses. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p.5476–5480, 2002.

HAYES, T.; HASTON, K.; TSUI, M.; HOANG, A.; HAEFFELE, C.; VONK, A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 PPB in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. **Environ. Health Persp.**, v. 111, n.4, p. 568–575, 2003.

HEBLING, N.J.; PENTEADO, A.M.G. Anatomia funcional de *Diplodon rotundus gratus* Wagner, 1827 (Mollusca, Bivalvia). **Rev. Brasil. Biol.**, v. 34, n.1, p. 67-80, 1974.

HENRY, R; SIMÃO, S.A. Evaluation of density and biomass of a bivalve population (*Diplodon delodontus expansus*) (Küster, 1856) in a small tropical reservoir. **Revue D'Hydrobiologie Trocale**, v.17, p.309-318, 1984.

HENRY, R., FILOSO, S. Spatial distribution of a bivalve population (*Diplodon delodontus expansus*) (KÜSTER, 1865) in a small tropical reservoir. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 45, n. 4, p. 407-415, 1985.

HENRY, R., FILOSO, S. Nutrient Release Through Decomposition of *Diplodon delodontus Expansus* (Mollusca, Bivalvia) and Some Considerations of its Effects on the Ecology of a Small Tropical Reservoir. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 47, n. 4, p. 479-486, 1987.

HOEH, W. R.; BOGAN, A.E.; CUMMINGS, K.S.; GUTTMAN, S.E. Evolutionary relationships among the higher taxa of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida): inferences on phylogeny and character evolution from analyses of DNA sequence Data. **Malacological Review**, v. 31, p.111–130, 1999.

HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE, PM.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress**. Flórida: Lewis Publishers Boca Raton, 1992.

JACOMINI, A.E.; BONATO, P.S.; AVELAR, W.E.P. HPLC method for the analysis of atrazine in freshwater bivalves. **Journal of liquid chromatography and related technologies**, v. 26, n. 12, p. 1885-1894, 2003.

JACOMINI, A.E.; AVELAR, W.E.P.; MARTINÊS, A.S.; BONATO, P.S. Bioaccumulation of Atrazine in Freshwater Bivalves *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) and *Corbicula fluminea* (Müller, 1774). **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 51, p. 387–391, 2006.

JACOMINI, A.E.; CAMARDO, P.B.; AVELAR, W.E.P.; BONATO, P.S. Assessment of Ametryn Contamination in River Water, River Sediment, and Mollusk Bivalves in São Paulo State, Brazil. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 60, p. 452–461, 2011.

JUNQUEIRA, L.C.; JUNQUEIRA, L.M.M.S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.123p.

JUPITER, S. D.; BYRNE, M. Light and scanning electron microscopy of the embryos and glochidia larvae of the Australian freshwater bivalve *Hyridella depressa* (Hyriidae). **Invert. Repro. Dev.**, v.32, p.177–186, 1997.

KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **J. Cell Biol.**, v. 11, p. 137-140, 1965.

KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L. J. G.; MARTENINGHE, A.; SANTOS, E.D.; ZANATTA, R. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, v.29, p.694-697, 2010.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian Cerrados. **Chemosphere**, v. 41, p 1441-1449, 2000.

LOAYZA-MURO, R.; ELIAS-LETTTS, R. Responses of the mussel *Anodontites trapesialis* (Unionidae) to environmental stressors: Effect of pH, temperature and metals on filtration rate. **Environmental Pollution**, v.149, p. 209-215, 2007.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas**. Nova Odessa: Editora Plantarum. 1990.

LUIZ, A.I.B.; NEVES, M.C.; DYNIA, J.F. **Implicações na qualidade das águas subterrâneas nas atividades agrícolas na região metropolitana de Campinas, SP**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2004. 33p.

MANLY, R E GEORGE , W. O. The occurrence of some heavy metals in populations of freshwater mussel *Anodonta anatina* from the river Thames. **Environ. Pollut.**, v. 14, p. 139-154, 1977.

MANSUR, M.C.D. Gloquídio de *Diplodon martensi* (Ihering) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) e seu ciclo parasitário. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, p.185-194, 1999.

MANSUR, M.C.D.; ANFLOR, L. M.; Diferenças morfológicas entre *Diplodon charruanus* ORBIGNY, 1835 e *D. pilsbryi* MARSHALL, 1928 (Bivalvia, Hyriidae). *Iheringia. Ser. Zool.*, v. 60, p.101-116, 1981.

MANSUR, M.C.D.; SANTOS, C. P. Invertebrados Aquáticos: *Diplodon Expansus*. In: MACHADO, A.B.M.; DRUMMOND, G.M.; PAGLIA, A.P (Eds). **Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção**, Belo Horizonte: Fundação Bioversitas. 2008.

MANTECCA, P.; VAILATI, G.; BACCHETTA, R. Histological changes and micronucleous inductions in the Zebra mussel *Dreissena polymorpha* after Paraquat exposure. **Histology and histopathology**, v. 21, p.829-840, 2006.

MATSUMOTO, S.T.; RIGONATO, J.; MANTOVANI, M.S; MARIN-MORALES, M.A. Evaluation of the gentotoxic potencial due to the action of an effluent contaminated with chromium, by the comet assay in CHO-K1 cultures. **Caryologia**, v. 58, n.1, p. 40-46, 2005.

MCCONNELL, M. A.; HARREL, R. C. The estuarine clam *Rangia cuneata* (Gray) as a biomonitor of heavy metals under laboratory and field conditions. **Am. Malacol. Bull.**, v. 11, n. 2, p.1991-2001, 1995.

MEYER, A.A.N.; OLIVEIRA, E.; MARTIM, J. Classes de comprimento e proporção sexual em *Diplodon expansus* (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) no rio Piraquara, Paraná, Brasil. **Iheringia**, Sér. Zool., v. 100, n.4, p.329-335, 2010.

MOORE, A.; WARING, C.P. Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.62, p.41–50, 1998.

MURPHY, M.B.; HECKER, M.; COADY, K.K.; TOMPSETT, A.R.; JONES, P.D.; DU PREEZ, L.H.; EVERSON, G.J.; SOLOMON, K.R.; CARR, J.A.; SMITH, E.E.; KENDALL, R.J.; VAN DER KRAAK, G.; GIESY, J.P. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. **Aquatic Toxicology**, v.76, p.230–245, 2006.

NAIMO, T.J. A review of the effects of heavy metals on freshwater mussels. **Ecotoxicology**, v.4, p.341-362, 1995.

NASCIMENTO, I.A.; PEREIRA, S.A.; LEITE, M.B.N.L. Biomarcadores como instrumentos preventivos de poluição. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e aplicações**. 2 ed. São Carlos: RiMa. 2008.

NESKOVIC, N.K.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; POLEKSIC, V.; BUDIMIR, M. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.25, p.173-182, 1993.

NOGAROL, L.R.; BROSSI-GARCIA, A.L.; FONTANETTI, C.S. Surface Morphology of *Diplodon expansus* (Küster, 1856) (Mollusca, Bivalvia, Hyriidae) Gill Filaments After Exposure to Environmentally Relevant Concentrations of Atrazine Herbicide. **Microscopy Research and Technique**, 2011. DOI 10.1002/jemt.21130.

OHYAMA, T.; JIN, K.; KATAH, Y.; CHIPA, Y.; INOVE, K. 1,3,5-trichloro-2-(4-nitrophenoxy) benzene (CNP) in water, sediments, and shellfish of the Ishikari river. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 37, p 344-349, 1986.

PARADA, E.; PEREDO, S. Estado actual de la taxonomía de bivalvos dulceacuícolas chilenos: progresos y conflictos. **Rev. Chil. Hist. Nat.**, v. 75, n. 4, p. 691–701, 2002.

PEARSE, A.G.E. **Histochemistry**: Theoretical and Applied. 4 th ed., London: J&A. Churchill, v.2, 1985. 998p.

PEREZ, D.G.; FONTANETTI, C.S. Hemocitical responses to environmental stress in invertebrates: a review. **Environ Monit Assess**, v.177, p. 437-447, 2011.

PREEZ, H.H.; VUREN, J.H.J. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 101, p. 651–655, 1992.

PROTASOWICKI, M.; DURAL, M.; JAREMEK, J. Trace metals in the shells of blue mussels (*Mytilus edulis*) from the Poland coast of Baltic sea. **Environ Monit Assess**, v.141, p. 329–337, 2008.

RIGONATO, J; MANTOVANI, M. S.; JORDÃO, B.Q. Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (Mollusca) tissues for the detection of genotoxicity. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.3, p.464-468, 2005.

RITTSCHOF, D.; MCCLELLAN-GREEN, P. Molluscs as multidisciplinary models in environment toxicology. **Mar. Pollut. Bull.**, Oxford, v. 50, p. 369-373, 2005.

ROSÉS, N.; POQUET, M.; MUNÓZ, I. Behavioural and Histological Effects of Atrazine on Freshwater Molluscs (*Physa acuta* Drap. and *Ancylus fluviatilis* Müll. Gastropoda). **J. Appl. Toxicol.**, v.19, p. 351–356, 1999.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados**: uma abordagem funcional e evolutiva. 7. ed. São Paulo: Rocca, 2005.

RUSSO, J.; LAGADIC, L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). **Environmental Pollution**, v. 127, p. 303–311, 2004.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios; Informações estatísticas da agricultura: anuário IEA 2002, Instituto de Economia Agrícola: São Paulo, 2007.

SEGNINI, M.I.B.; MEDINA, J.; MARCANO, S.; FINOL, H.J. Alteraciones ultraestructurales de los hepatocitos de *Caquetaia kraussii* (PISCES: CICHLIDAE) debido a la atrazina. **Acta Microscópica**, v.18, n. 2, p.81-84, 2009.

SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental, 167-178. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SILVESTRE, F.; TRAUSCH, G.; SPANÒ, L.; DEVOS, P. Effects of atrazine on osmoregulation in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 132, p.385–390, 2002.

Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola – SINDAG. MENTEN, J.O. M; SAMPAIO, I. A.; MOREIRA, H.; FLORES, D.; MENTEN, M. O setor de defensivos agrícolas no Brasil, 2009. Disponível em <http://www.sindag.com.br/dados_mercado.php>. Acesso em: 20 de janeiro de 2011.

SKIPPER, H.D.; GILMOUR, C.M.; FURTICK, W.T. Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v. 31, p. 653–656, 1967.

SHEEHAN, D.; POWER, A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanisms of bivalve mollusks. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 123, p. 193–199, 1999.

SOTO, D.; MENA, G. Filter feeding by the freshwater mussel, *Diplodon chilensis*, as a biocontrol of salmon farming eutrophication. **Aquaculture**, v.171, p.65–81, 1999.

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C.S. DNA damage of erythrocytes of *Oreochromis niloticus*, after acute exposure to river water receiving effluent from an oil refinery. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology-JBSE**, no prelo.

STEINBERG, C.E.W.; LORENZ, R.; SPIESER, O.H. Effect of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. **Water Res.**, v.29, p.981–985, 1995.

STORELLI, M.M.; MARCOTRIGIANO, G.O. Heavy Metal Monitoring in Fish, Bivalve Molluscs, Water, and Sediments from Varano Lagoon, Italy. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 66, p. 365–370, 2001.

SUNILA, I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Filand (Baltic Sea). **Ann. Zool. Fenn.**, v. 24, p. 55-69, 1987.

SUNILA, I. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants. **J. Invertebr. Pathol.**, v.52, p. 137-141, 1988.

SZE, P.W.C.; LEE, S.Y. The Potential Role of Mucus in the Depuration of Copper from the Mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). **Marine Pollution Bulletin**, v.31, n. 4-12, p. 390-393, 1995.

TOMAZELLI, A.C.; MARTINELLI, L.A.; AVELAR, W.E.P.; DE CAMARGO, P.B.; FOSTIER, A.H.; FERRAZ, E.S.B., KRUG, F.J.SANTOS-JUNIOR, D. Biomonitoring of Pb and Cd in Two Impacted Watersheds in Southeast Brazil, Using the Freshwater Mussel *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1891) (Bivalvia:Mycetopodidae) as a Biological Monitor. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46, n.4, p.673-684, 2003.

TÜRKMEN, M.; CIMINLI, C. Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. **Food Chemistry**, v.103, p. 670–675, 2007.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, Madri, v. 1, p. 10-13, 1998.

UNO, S.; SHIRAISHI, H.; HATAKEYAMA, S.; OTSUKI, A. Uptake and depuration kinetics and BCFs of several pesticides in three species of shellfish (*Corbicula leana*, *Corbicula japonica*, and *Cipangopludina chinensis*): comparison between field and laboratory experiment. **Aquat Toxicol**, v. 39, p. 23–43, 1997.

USHEVA, N.; ODINTSOVA, N.A. Hyperplastic growth of mucous cells in the mantle of the mussel *Modiolus kurilensis* from a heavily polluted area of Amursky Bay, Sea of Japan. **Dis Aquat Org**, v. 33, p. 235-238, 1998.

VAUGHN, C.C.; NICHOLS, S.J.; SPOONER, D.E. Community and food web ecology of freshwater mussels. **Journal of the North American Benthological Society**, v.27, p. 409–423, 2008.

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.90, p.42–51, 2008.

VESK, P.A.; BYRNE, M. Metal levels in tissue granules of the freshwater bivalve *Hyridella depressa* (Unionida) for biomonitoring: the importance of cryopreparation. **The Science of the Total Environment**, v.225, p.219-229, 1999.

VILLAR, C.; STRIPEIKIS, J.; D'HUICQUE, L.; TUDINO, M.; TROCCOLI, O.; BONETTO, C. Cd, Cu, and Zn concentrations in sediments and the invasive bivalves *Limnoperna fortunei* and *Corbicula fluminea* at the Rio de La Plata basin, Argentina. **Hydrobiologia**, v. 416, p. 41-49, 1999.

YAMAGISHI, T.; MIYAZAKI, K.; AKIYAMA, K.; MORITA, M.; NAKAGAWA, J.; HORII, S.; KANEKO, S. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in commercial diphenyl ether herbicides, and in freshwater fish collected from the application area. **Chemosphere**, Oxford, v.10, p. 1137–1144, 1981.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. **Principles of Ecotoxicology**. Taylor & Francis Eds., 1997. 321 p.

WALKER, K.F.; BYRNE, M.; HICKEY, C.W.; ROPER, D.S. Freshwater mussels (Hyriidae) of Australasia. In: BAUER, G.; WÄCHTLER, K. (Orgs.). **Ecology and Evolution of the Freshwater Mussels Unionoida**. Springer-Verlag: Heidelberg, 2001. p.5-31.

WARD, G.S.; BALANTINE, L. Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna. **Estuaries**, v.8, n.1, p.22-27, 1985.

YANG, L.; ZHA, J.; LI, W.; LI, Z.; WANG, Z. Atrazine affects kidney and adrenal hormones (AHs) related genes expressions of rare minnow (*Gobiocypris rarus*). **Aquatic Toxicology**, v. 97, p. 204-211, 2010.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2.ed. São Carlos: RiMa, 2008. 486p.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J. SHI, J, JIANG, G. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 135-150, 2008.

ZUPAN, I; KALAFATIC, M. Histological effects of low atrazine contamination on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 70, p. 688-695, 2003.