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

**ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE RASTROS BRANQUIAIS E FÍGADO
DE *Prochilodus lineatus* (CURIMBATÁ) APÓS EXPOSIÇÃO A
ALQUILBENZENO SULFONATO LINEAR (LAS)**

JOÃO RODOLFO TUCKUMANTEL VALIM

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)

Março - 2017

JOÃO RODOLFO TUCKUMANTEL VALIM

**ANÁLISE MORFOFISIOLOGIA DE RASTROS BRANQUIAIS E FÍGADO DE
Prochilodus lineatus (CURIMBATÁ) APÓS EXPOSIÇÃO A
ALQUILBENZENO SULFONATO LINEAR (LAS)**

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)

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes

Rio Claro - SP
2017

574.87 Valim, João Rodolfo Tuckumantel
V172a Análise morfofisiológica de rastros branquiais e fígado de *Prochilodus lineatus* (Curimatá) após exposição a alquilbenzeno sulfonato linear (LAS) / João Rodolfo Tuckumantel Valim. - Rio Claro, 2017
68 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Flávio Henrique Caetano
Coorientador: Karen Cristiane Martinez de Moraes

1. Citologia 2. Biologia celular e estrutural. 3. Prochilodontidae. 4. Brânquia. 5. Hepatócitos. 6. Morfofisiologia. 7. Detergente. I. Título.

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

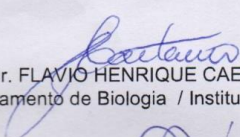
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE RASTROS BRANQUIAIS E FÍGADO DE *Prochilodus lineatus* (CURIMBATÁ) APÓS EXPOSIÇÃO A ALQUILBENZENO SULFONATO LINEAR (LAS)

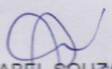
AUTOR: JOÃO RODOLFO TUCKUMANTEL VALIM

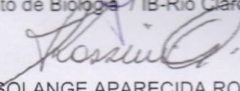
ORIENTADOR: FLAVIO HENRIQUE CAETANO

COORDENADORA: KAREN CRISTIANE MARTINEZ DE MORAES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE CAETANO
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Profa. Dra. MARIA IZABEL SOUZA CAMARGO
Departamento de Biologia / IB-Rio Claro


Profa. Dra. SOLANGE APARECIDA ROSSINI DE OLIVEIRA
Faculdades Integradas Einstein de Limeira / Faculdades Integradas Einstein de Limeira

Rio Claro, 23 de fevereiro de 2017

À minha própria superação.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha família por todo apoio e paciência. Não há palavras suficientes que eu pudesse escrever aqui para demonstrar toda minha gratidão a vocês.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), não só pelo apoio e infraestrutura fornecida para o desenvolvimento deste projeto, mas também por todo conhecimento adquirido e por todas as experiências vividas aqui, as quais contribuíram muito para minha formação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, que coadjuvou durante minha passagem pela Universidade, por todo apoio e ensinamentos obtidos do começo ao fim do projeto. Ensinamentos estes não só em formação acadêmica mas como experiências de vida que levarei comigo. Não mediu esforços para me ajudar e graças a ele não somente atingi como também ultrapassei minhas expectativas. Um exemplo de pesquisador/pessoa que terei durante meus próximos passos daqui em diante. Sou muitíssimo grato. À minha Co-orientadora Prof^a. Dra. Karen Cristiane Martinez de Moraes, que abrilhantou nosso estudo com seus conhecimentos acerca da Biologia Molecular. Muito obrigado.

À UNESP, em específico ao seu Laboratório de Histologia do Departamento de Biologia da Unesp de Rio Claro, pelo apoio e infraestrutura. E claro, aos servidores técnicos e administrativos, em especial ao Gerson Mello Souza e à Mônica Lamonte, os quais contribuíram no desenvolvimento do projeto e me acompanharam no decorrer de minha formação.

Aos meus amigos que me acompanharam de perto e que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste projeto. E aos meus colegas que passaram por mim durante esta etapa, os quais me mostraram, até mesmo sem saberem, como a convivência dentro e fora de sala de aula e a partilha de experiências podem nos formar para a *vida*.

“In youth we learn, in age we understand.”

(Marie von Ebner-Eschenbach, 1893)

Resumo

Devido ao crescente impacto ambiental que grande parte de corpos d'água no Brasil vem sofrendo, tornam-se cada vez mais necessários estudos sobre as alterações causadas nesses ambientes. Dentre as substâncias contribuintes de tais alterações, destacam-se os detergentes biodegradáveis, que têm sido alvo de diversos trabalhos e, em específico, o alquilbenzeno sulfonato linear (LAS), o qual representa um dos surfactantes aniônicos mais utilizados do mercado. Em se tratando de meio aquático, já é sabida a importância das brânquias para trocas gasosas, alimentação e osmorregulação, bem como biomarcador. Lembrando que os rastros branquiais fazem parte das brânquias e que desempenham um papel importante na retenção e deglutição do alimento e, assim como os filamentos branquiais, na osmorregulação; e também a importância do fígado como principal órgão no processo de detoxificação de xenobióticos, e por isso está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (MADUENHO et al., 2008). Este projeto pleiteou investigar as prováveis alterações morfofisiológicas (histológicas, histoquímicas e ultramorfológicas) nos rastros branquiais e no acúmulo de grânulos de lipofuscina no fígado em *Prochilodus lineatus* (curimatã), quando em contato direto e constante ao contaminante. Este estudo visou também realizar uma análise molecular de expressão do gene relacionado ao acúmulo de lipofuscina e então avaliar a sensibilidade e a relevância de tais efeitos no envelhecimento precoce do fígado. Os resultados demonstram efeitos morfológicos que afetam parâmetros fisiológicos após exposição ao LAS, detectados logo nos primeiros dias de tratamento. Dentre estes, destacam-se alterações estruturais do epitélio, variação das células de muco, ambas acometidas nos rastros branquiais, e também o acúmulo de lipofuscina no fígado acompanhado de aumento de expressão gênica que regula estes grânulos. Todas elas foram agravadas ainda mais proporcionalmente ao aumento do tempo de exposição e à concentração do surfactante.

Palavras-chave: Prochilodontidae, brânquia, hepatócitos, morfofisiologia, detergente.

Abstract

Global pollution has been affecting the most of our water bodies and therefore it has turned our attention to the importance of more studies about disturbances in these environments. Among the substances that contribute to such changes, we highlight the biodegradable detergents, which have been focus of several works and, specifically, the Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS), which represents one of the most commonly used anionic surfactants on the market. Concerning to aquatic environment, it is already known the importance of gills for gas exchange, feeding, osmoregulation and biomarker as well. Regarding that gill rakers belong to gills and play an important role in retention and food swallowing and, like the gill filaments, in osmoregulation; also the importance of the liver like the main organ in xenobiotic detoxification process, and therefore it is subjected to changes, since this usually accumulates higher concentrations of toxic substances (MADUENHO et al., 2008). Our project aimed to investigate the likely morphophysiological alterations (histological, histochemical and ultra-morphological) in gill rakers and the lipofuscin accumulation in *Prochilodus lineatus* (curimbatá), when in direct and constant contact to contaminants. We also wished to accomplish molecular analysis of gene expression related to lipofuscin accumulation and then evaluate sensitivity and importance of such effects in liver premature aging. Results show morphological alterations affecting physiological parameters after exposure to contaminant, immediately detected during the beginning of treatment. Among them, we stand out structural changes in epithelium, variation in mucus cells, both them affected in gill rakers and also in lipofuscin accumulation in the liver together with gene expression enlargement, further worsening according to increased exposure time and to higher surfactant concentration.

Key words: Prochilodontidae, gill, hepatocytes, morphophysiology, detergent.

.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	09
2. Objetivos.....	10
1. Objetivos específicos	10
3. Justificativa	10
4. Revisão da literatura.....	11
1. <i>Prochilodus lineatus</i>	11
2. Rastros branquiais	13
3. Fígado	14
4. Detergentes biodegradáveis	15
5. Lipofuscina.....	16
5. Material	18
6. Métodos	19
1. Amostragem e tratamentos	19
2. Rastros branquiais	21
a) Análises histológicas e histoquímicas	21
b) Análise ultramorfológica	22
c) Análise morfofisiológica e contagem de células de muco	22
3. Fígado	23
a) Quantificação de lipofuscina	23
b) Análise da expressão gênica	25
7. Resultados.....	27
1. Análise química da água.....	27
2. Rastros branquiais	28
7.2.1. Morfologia dos rastros branquiais.....	28
7.2.2. Contagem de células de muco	29
a) Técnica de PAS	29
b) Técnica de Alcian Blue (pH 2,5 e 1,0).....	32
c) Técnica de Von Kossa	33
7.2.3. Microscopia eletrônica de varredura.....	34
3. Fígado.....	38
7.3.1. Quantificação de lipofuscina	38

7.3.2. Expressão gênica	42
8. Discussão	44
9. Conclusões.....	50
10. Referências.....	51
Anexos	62
1. Protocolos das técnicas histológicas.....	62
2. Decisão do Comitê de Ética no Uso de Animais	64
3. Análise química da água utilizada	65
4. Análise química da concentração real de surfactante	68

1. Introdução

Em ambientes aquáticos, os peixes são um dos organismos mais comumente utilizados na avaliação de impactos ambientais, de forma que essas populações são adequadas para estudos de toxicidade (GOULART & CALISTO, 2003). Além do mais, a espécie *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836), a qual foi escolhida para este projeto, é frequentemente utilizada em pesquisas e em estudos de toxicidade

(ALVES, 2015; CAMARGO & MARTINEZ, 2007; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; MADUENHO et al., 2007; MARTINEZ & SOUZA, 2002; MARTINEZ et al., 2004; PEREIRA & CAETANO, 2009; PEREIRA et al., 2012a; PEREIRA et al., 2012b; SIMONATO et al., 2008).

Segundo Romão et al. (2006), o uso de alterações morfológicas demonstrou ser uma ferramenta eficiente para identificar e diagnosticar as consequências fisiológicas da exposição a agentes contaminantes. Em complemento, a análise histológica é uma técnica bastante aplicada para avaliação dos impactos ambientais e para a análise de órgãos-alvo sensíveis a ambientes perturbados, como as brânquias (MAZON et al., 2002), afim de detectar os efeitos e lesões que esses agentes provocam (SCHWAIGER et al., 1997).

A brânquia, assim como também o fígado, é considerada alvo de vários tipos de contaminantes, logo, alterações morfológicas na sua estrutura são amplamente utilizadas como indicadores de contaminação (MAZON et al., 2002). Assim, a presença de alterações estruturais nos rastros branquiais pode validar a eficiência do seu epitélio como biomarcador.

Por sua vez, o fígado é um órgão muito irrigado devido às suas funções de processamento e armazenagem de nutrientes absorvidos no trato digestivo e de neutralização e eliminação de toxinas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Contudo, por ser o principal órgão no processo de detoxificação de xenobióticos, está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (MADUENHO et al., 2008).

2. Objetivos

O presente estudo visou realizar uma análise morfofisiológica de rastros branquiais e fígado por meio de análises histológicas, ultramorfológicas e moleculares de peixes da espécie *Prochilodus lineatus* após a exposição ao LAS.

2.1. Objetivos Específicos

Para perfazer o objetivo acima, este trabalho pleiteou os seguintes:

- Identificar alterações morfofisiológicas no epitélio dos rastros branquiais, em especial, nas células de muco;
- Analisar os efeitos de detergentes biodegradáveis no acúmulo de lipofuscina no fígado;
- Avaliar a expressão do gene 555506, o qual está relacionado com o acúmulo de lipofuscina em peixes;

3. Justificativa

Devido ao crescente impacto ambiental que grande parte de corpos d'água no Brasil vem sofrendo, tornam-se cada vez mais necessários estudos sobre as alterações causadas aos animais nestes ambientes. Além disso, os rastros são estruturas significativas para os peixes por estarem em contato direto e constante com o meio, estando também diretamente expostos a contaminantes; já o fígado é bastante conhecido o importante papel que este desempenha quando se trata de detoxificação de xenobióticos.

A escolha da espécie *P. lineatus* foi devido a sua importância econômica e abundância na bacia do Rio Mogi-Guaçu. Ademais, é uma espécie de fácil manejo e criação e que vem demonstrando ser boa para análise de toxicidade.

4. Revisão da Literatura

4.1. *Prochilodus lineatus*

Os prochilodontídeos estão distribuídos pela América do Sul e principalmente a leste dos Andes (REIS et al., 2003). Eles ocorrem nas bacias dos rios Orinoco, Amazonas, Tocantins e da Prata, nos rios costeiros das Guianas, no rio São Francisco e outros rios costeiros do leste do Brasil; e na porção norte da bacia da Lagoa dos Patos, no Sul do Brasil, com apenas uma espécie a oeste dos Andes, na Colômbia (REIS et al., 2003). Segundo estes mesmo autores, os gêneros dos Prochilodontidae são muito importantes na pesca comercial e de subsistência, com destaque para as bacias do sudeste do país. Além disso, os curimbatás possuem crescimento rápido e elevada rusticidade, o que os torna propícios para a criação e de grande importância para pesquisas (BRITSKI, 1972).

Os indivíduos desta família são peixes de porte moderado a grande (*P. lineatus* pode atingir até cerca de 60 cm), robustos, com escamas relativamente grandes e podem ser reconhecidos, em sua fase adulta, através dos lábios carnosos e de suas duas séries de dentículos relativamente pequenos, falciformes e móveis (REIS et al., 2003). Em relação à alimentação, todos os seus representantes são exploradores de detritos em superfícies subaquáticas (iliofagia) e por isso, esses peixes possuem um papel muito significativo no fluxo de energia nos sistemas aquáticos que habitam (REIS et al., 2003). A espécie alimenta-se principalmente de sedimentos inorgânicos (52.8% dos itens alimentares), detritos orgânicos, algas, testáceos e nemátodos (FUGI, HANH & AGOSTINHO, 1996) e o pico de alimentação desses animais varia entre 3 e 9 horas após o nascer do sol (FUGI, HANH & AGOSTINHO, 1996).

Ainda segundo Reis et al. (2003), os curimbatás também são caracterizados pela reofilia (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema. No Rio Mogi-Guaçu, localizado no estado de São Paulo/Brasil, a espécie migra de 150 a 500 km abaixo da Cachoeira de Emas, passa pela cachoeira duas vezes ao ano, entre outubro e dezembro durante a piracema, e entre janeiro e fevereiro durante a descida (TOLEDO-FILHO et al., 1986).

Prochilodus lineatus já foi alvo de inúmeras pesquisas (ALVES, 2015; MESCHIATTI & ARCIFA, 2009; PAULINO, 2011; PEREIRA et al., 2012a; PEREIRA et al., 2012b; TOLEDO-FILHO et al., 1986), além do mais, espécies do gênero

Prochilodus representam grande parte da ictiofauna da bacia do Rio Mogi-Guaçu (figura 1.1) (MESCHIATTI & ARCIFA, 2009). A bacia possui área de drenagem de 14.653 km², é integrada por 48 municípios e seus principais rios são: Rio Mogi Guaçu, Rio do Peixe e Rio Jaguari-Mirim (CBH-MOGI – Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu, 1999). Portanto, a espécie claramente apresenta grande potencial como modelo para ambientes neotropicais, visto a importância que ela tem e sendo utilizada por inúmeros estudos de toxicidade.



Figura 1.1. Esquema da bacia do Rio Mogi-Guaçu. Fonte: SigRH - Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos (2015).

4.2. Rastros Branquiais

Os rastros branquiais são estruturas originadas a partir da mesoderme, inserem-se nos ossos que compõem os arcos branquiais e estão voltados para a região ventral dos mesmos (SAMPAIO & GOULART, 2011). Os rastros têm como principal função reter o alimento, além de facilitar a deglutição (SAMPAIO & GOULART, 2011). Eles são constituídos por uma parte óssea envolvida por um tecido epitelial pavimentoso estratificado formado por células mucosas, corpúsculos gustativos, células pavimentosas poligonais, células ricas em mitocôndria (células de cloro) e uma parte de tecido cartilaginoso (LIMA et al., 2009; MACIEL, 2006). Além disto, os rastros branquiais ainda podem conter estruturas denominadas dentículos, os quais contribuem para a retenção do alimento (MONTNEGRO, 2009; RODRIGUES & MENIN, 2006).

As diferentes formas, tamanho, quantidade e disposição dos rastros, juntamente com o formato da boca, dos dentes faringianos e das brânquias, podem contribuir para a determinação do hábito alimentar do peixe

(FERRETI et al., 1996; LOLIS & ANDRIAN, 1996; MACHADO, 1999; MACIEL, 2006; MONTNEGRO, 2009; MORAES & BARBOLA, 1995; NEUMANN, 2008; OLIVEIRA RIBEIRO & MENIN, 1996; PAES, 2008; PAULINO, 2011; RODRIGUES & BEMVENUTI, 2001; SAMPAIO & GOULART, 2011).

Peixes com rastros finos, longos e numerosos se alimentam de partículas pequenas enquanto que aqueles com rastros redondos, curtos e em menor quantidade se alimentam de partículas maiores (OLIVEIRA RIBEIRO & MENIN 1996; RODRIGUES & BEMVENUTI, 2001). Em espécies onívoras, por exemplo, normalmente os rastros são curtos, muito finos, abundantes, bem próximos e sobrepõem-se aos rastros de outros arcos branquiais, formando uma rede bem fina para retenção do alimento (ALVES, 2009; MACIEL, 2006; SAMPAIO & GOULART, 2011). Em *P. lineatus*, os rastros são curtos, laminares e oblíquos, além de muito espessos e de consistência mole (MORAES et al., 1997) (figura 1.2).

Fuji & Hahn (1991) sugerem que tais formas dos rastros de *P. lineatus* estão relacionadas com a função de produção de muco e de separação de detritos floculentos por adesão. Além disso, Menin (1988) acrescenta que o órgão branquial de *Prochilodus* constitui um sistema especializado que atua tanto na seleção e

retenção de pequenas partículas orgânicas, quanto na proteção dos filamentos branquiais contra o lodo e os detritos ingeridos pelos peixes.

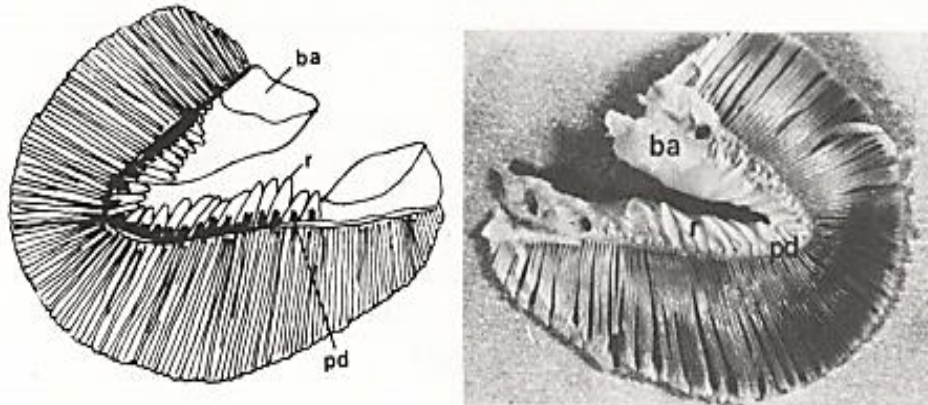


Figura 1.2. Esquema (esquerda) e micrografia (direita) de arco branquial de *Prochilodus lineatus* com detalhes para os rastros branquiais. Bordo anterior do arco branquial (ba), processo digitiforme (pd), rastrro branquial (r). Fonte: Moraes et al. (1997).

4.3. Fígado

É um órgão composto basicamente por hepatócitos, que são células poliédricas com seis ou mais superfícies (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Este tecido é bastante irrigado devido às suas funções de processamento e armazenagem e nutrientes absorvidos no trato digestivo e de neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. Além disso, segundo Maduenho et al. (2008), justamente por ser o principal órgão responsável pelo processo de detoxificação de xenobióticos, o fígado está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de toxinas. Em estudos realizados por estes mesmos autores com a espécie *P. lineatus*, foi possível identificar estágios de degeneração do fígado após a exposição dos animais a DFB (diflubenzuron), sendo que o estágio I foi caracterizado por apresentar agregados de melanomacrófagos, hipertrofia celular e nuclear e núcleos dos hepatócitos deslocados para a periferia; o segundo estágio apresenta vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos. Segundo Simonato et al. (2008), peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações em seus fígados como hipertrofia do núcleo, núcleos em posição lateral, vacuolização do citoplasma, degeneração do citoplasma, entre outras.

4.4. Detergentes Biodegradáveis

Os detergentes são compostos de longas cadeias de hidrocarbonetos, que formam grupos hidrofóbicos e um ou mais grupos polares, os grupos hidrofílicos; as partes não polares de tais moléculas dissolvem-se em gorduras e óleos e as porções polares são solúveis em água (ALLINGER et al., 1978).

Segundo Allinger et al. (1978), a indústria de detergentes se baseia nos alquilbenzenos, surfactantes que quando neutralizados formam dodecilbenzenos sulfonados de sódio, um tipo de alquilbenzeno sulfonato linear (LAS). O LAS passou a ser utilizado a partir de 1964 como substituto de rápida degradação para os alquilbenzenos sulfonatos altamente ramificados (ABS) na indústria de detergentes e representa um dos surfactantes aniônicos mais utilizados do mercado (HERA, 2009).

Os detergentes com esta composição são considerados brandos por possuírem uma cadeia lateral linear alifática e serem biodegradáveis, logo, isto significa que podem ser metabolizados por bactérias nas estações de tratamento de esgotos (ALLINGER et al., 1978). Todavia, da maneira que vêm sendo utilizados atualmente, eles têm sido alvo de críticas e apontados como responsáveis pelo fenômeno de eutrofização, quando despejados em rios (ALLINGER et al., 1978). Isto ocorre devido ao alto teor de fosfato em sua composição, o que por sua vez, provoca um aumento de velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninhas, e conseqüentemente, uma diminuição de oxigênio disponível na água (ALLINGER et al., 1978).

Em corpos d'água movimentados, como rios, registros das concentrações de LAS variaram de 0.36 a 0.49 mg/L em locais que recebiam efluentes de estações de tratamento de esgoto baseadas em técnicas anaeróbias, e de 0.31 a 0.06 mg/L em corpos que recebiam efluentes de estações de tratamento de esgoto baseadas em técnicas de oxidação (MUNGRAY & KUMAR, 2009). Desta forma, os autores concluíram que certas concentrações de LAS são encontradas em corpos de água mesmo quando os efluentes são submetidos a diferentes processos de tratamento de esgoto.

4.5. Lipofuscina

O aumento da quantidade de poluentes despejados em ambientes aquáticos reforça a importância do monitoramento químico e biológico destes ecossistemas (PINTO et al., 2010). Ainda de acordo com estes mesmos autores, o uso de biomarcadores tornou-se uma ferramenta para tal avaliação. Uma gama de testes baseados em biomarcadores de estresse tem sido utilizados para identificar os efeitos de poluentes em organismos aquáticos, os quais revelaram alterações sob diversos parâmetros, como por exemplo a estabilidade da membrana lisossomal, conteúdo lipídico e a presença de lipofuscina nas células.

Segundo Arking (2008), os grânulos de lipofuscina foram observados pela primeira vez em 1842 juntamente com possibilidade de uma relação entre o seu acúmulo e o envelhecimento, e desde então, numerosos estudos foram realizados em busca de compreender os mecanismos responsáveis pela formação de tais grânulos afim de esclarecer seu papel no processo de senescência. Segundo o mesmo autor, a teoria do acúmulo de resíduos propõe que o envelhecimento celular é causado pela aglomeração de produtos residuais intracelulares que não podem ser destruídos ou eliminados exceto por meio do processo de divisão celular. Pode ainda, desta forma, ser encarada como um indicador de envelhecimento.

Estudos de Silva & Silva (2005), Scbutt et al. (2003) e Kishi et al. (2008) mostraram que estes grânulos são produto da peroxidação lipídica e uma evidência de lesão oxidativa. Segundo Terman & Brunk (1998), os diversos materiais formadores dos grânulos de lipofuscina são inicialmente sequestrados por um autofagossomo e, posteriormente, fundem-se a um lisossomo primário ou secundário (PEIXOTO et al., 2002). Os produtos finais são resultantes da glicosilação não-enzimática celular e por degradação incompleta de mitocôndrias danificadas, que não podem ser degradados pelas hidrolases lisossomais nem ser exocitadas (SILVA & SILVA, 2005; SCBUTT et al., 2003; KISHI et al., 2008). Estes resíduos não são degradados durante a divisão celular, acumulando-se ao longo do tempo nas células pós-mitóticas e podendo resultar no aparecimento de doenças. Estas estruturas, de acordo com Terman & Brunk (1998) e Kodama et al. (2005), são geralmente envoltas por duas unidades de membranas e não possuem enzimas lisossomais. Tanto os precursores da lipofuscina quanto suas formas finais, englobadas por vesículas lisossomais assim como descrito por Terzibazi et al. (2008), podem ser encontrados

em diversos organismos e possuem uma característica marcante que é a autofluorescência.

Segundo Radu et al. (2005), um dos principais componentes da lipofuscina é a bisretinoide N-retinolidina-retinoletanolamina (A2E), que confere à lipofuscina sua autofluorescência. As propriedades biológicas da A2E têm sido extensivamente estudadas, demonstrando possuir várias propriedades citotóxicas, como por exemplo, a inibição das funções degradativas dos lisossomos, a indução da apoptose e pode agir como um detergente catiônico, dissolvendo as membranas celulares. O principal gene relacionado à formação da lipofuscina é o gene ABCA4, cuja baixa expressão gera o acúmulo deste pigmento, o que pode ocorrer não só com o envelhecimento, mas também com o estresse oxidativo. Em peixes, a proteína que exerce esta função é a CH211-195I6.3, expressa pelo gene 555506. Segundo Arking (2008), a lipofuscina não parece ser muito reativa quimicamente e, provavelmente, não interfere no funcionamento adequado da célula no nível químico. Entretanto, a obstrução mecânica e/ou a interferência com outros processos celulares é certamente uma possibilidade.

Deve-se ser enfatizado também que grande parte dos poluentes despejados em ambientes aquáticos são comprovadamente formadores de radicais livres nas células, alterando o estado fisiológico das células. Segundo Arking (2008), um efeito ambiental que modula o envelhecimento, comum nos organismos, é a exposição cumulativa do organismo a um componente ambiental onipresente que age como uma toxina àquela espécie. O autor ainda complementa que seu efeito seria, com frequência, capaz de gradualmente induzir a uma disfunção fisiológica após o limite fisiológico ser excedido. Alguns destes poluentes podem causar proliferação de peroxissomos, os quais carregam enzimas antioxidantes, responsáveis pela limpeza de diversos radicais livres.

5. Material

Foram utilizados 108 indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus* em estágio juvenil, os quais se encontravam aproximadamente com 8 a 12 centímetros de comprimento (figura 2.1). Os peixes foram obtidos na Piscicultura Polettini em Mogi Mirim/SP, Brasil e foram alimentados com ração própria para peixes tropicais (Poytara Disco, produzida pela Poytara®).



Figura 2.1. Espécime juvenil de *P. lineatus*. Fonte: elaborado pelo autor.

Os indivíduos foram mantidos em três tanques de polietileno com capacidade de 310 litros cada (figura 2.2), todos equipados com filtro ultravioleta (UV) para prevenir eventuais contaminações, filtro convencional, aquecedores para manter a temperatura e fundo composto de areia para adequar o ambiente, visto que os peixes são de fundo e raspadores. As caixas foram aeradas constantemente por bombas de água individuais localizadas em caixas de polietileno com 150 litros de capacidade.

Para o processamento do material e para as análises histoquímicas e histológicas, foram utilizadas as instalações do Laboratório de Histologia, microscópio de campo claro Leica DM 2000 provido de câmera DFC280 para captura de imagens e também o microscópio de fluorescência Olympus – BX51. Já para o processamento das análises moleculares, foi utilizado o Laboratório de Biologia Molecular; e para o processamento do material para as análises ultramorfológicas, foram utilizadas as instalações do Laboratório de Microscopia Eletrônica e o microscópio eletrônico de varredura Hitachi TM3000. Todos os laboratórios são pertencentes a UNESP – Rio Claro/SP.

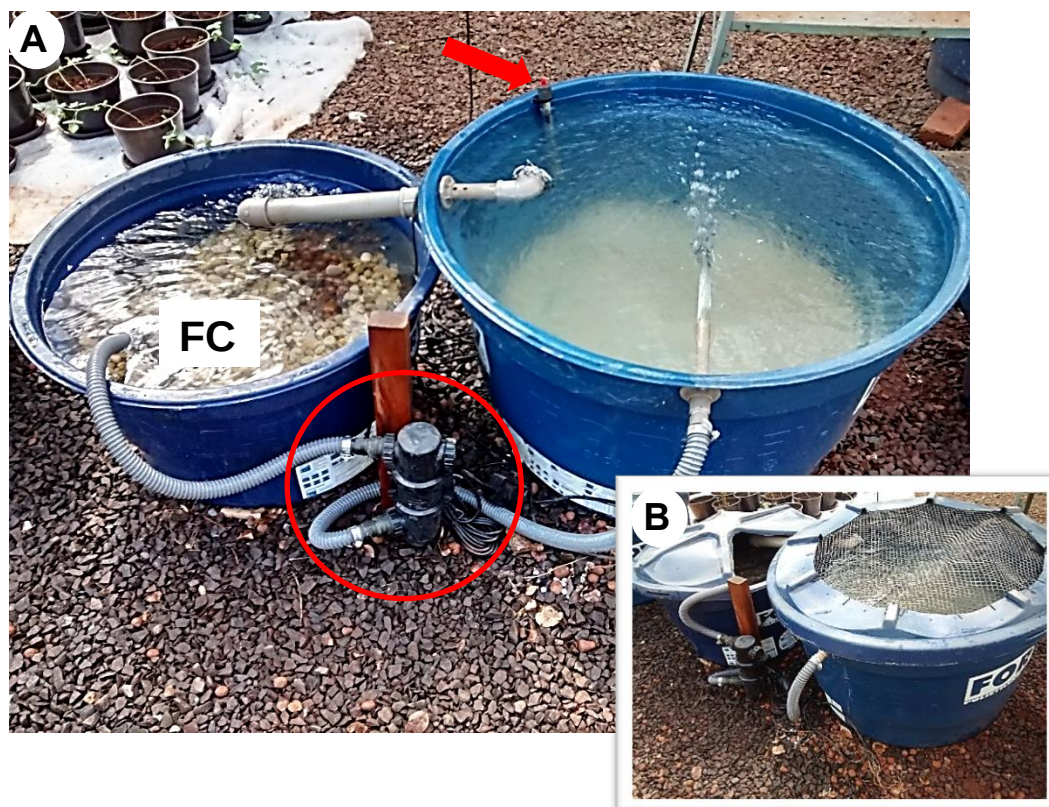


Figura 2.2. **A.** Tanques de polietileno abertos e com fundo de areia (à direita). Filtro UV (círculo), filtro convencional (FC) e aquecedor (seta). **B.** Tanques fechados com cobertura de proteção. Fonte: elaborado pelo autor.

6. Métodos

6.1. Amostragem e tratamentos

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: o grupo controle foi exposto à água do poço artesiano da UNESP – Rio Claro/SP, que recebe posterior tratamento com cloro, segundo as normas da Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), para eliminar as possíveis contaminações da mesma. O tratamento 1 foi exposto a uma diluição de 0.36 mg/L de LAS, adquirido junto à Sigma-Aldrich® (código 289957), que foi acrescida na mesma água utilizada no grupo controle para que os parâmetros químicos, como a concentração de cloro, fossem mantidos os mesmos. O tratamento 2 foi exposto a uma diluição de 3.6 mg/L de LAS (também acrescida na mesma água utilizada no grupo controle), pois segundo Mungray & Kumar (2009), as concentrações desse surfactante giram em torno de 0.36 a 0.49 mg/L em águas de rios que recebem efluentes de estações de tratamento de esgoto e 3.6 a 4.9 mg/L em efluentes de estações de tratamento de esgoto. Além

disso, o estudo pretendeu detectar alterações morfofisiológicas devido à exposição em longo prazo e já em níveis baixos do contaminante.

Realizou-se replicata de todos os experimentos e dos 108 indivíduos do total, 54 foram usados em cada repetição. 18 espécimes foram utilizados em cada grupo experimental (controle, tratamento 1 e tratamento 2), resultando em uma amostra de 6 indivíduos por grupo/tempo (3 tempos diferentes) para as análises histológicas e histoquímicas; ao passo que para as análises ultramorfológicas e de expressão gênica foram amostrados três indivíduos por grupo/por tempo.

Todos os indivíduos foram aclimatados em seus respectivos tanques por duas semanas antes que cada experimento começasse, utilizando fotoperíodo natural de meses do verão. Após a aclimação, iniciou-se o tratamento e 3 coletas foram realizadas em 14, 21 e 30 dias de exposição, visando detectar com precisão em quanto tempo causaria danos aos tecidos. Antes de cada coleta, todos os animais entraram em jejum de 48 horas. Durante o experimento, a água dos tanques foi reposta semanalmente, aproximadamente 10 litros de água por semana em cada caixa, por isso as concentrações foram reajustadas proporcionalmente ao volume perdido e à própria degradação do LAS. Para avaliar a real concentração de surfactante nas águas utilizadas, amostras de cada tratamento foram colhidas após as coletas e submetidas a análises químicas cromatográficas por meio de HPLC (*High performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência) *Agilent Technologies 1200 series*, com detector de fluorescência, na empresa Global Análise & Consultoria – São Carlos/SP, Brasil. Os resultados constam no anexo 4.

Para as coletas, antes dos indivíduos serem sacrificados, os espécimes foram anestesiados em solução de benzocaína (0.1 g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico, para cada 100 mL de água deionizada), conforme aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNESP – Rio Claro/SP, processo nº 031/2012 (anexo 2).

Como alguns componentes da água podem afetar a morfologia celular e outros parâmetros biológicos. Para avaliação de toxicidade foram realizadas análises das águas utilizadas nos dois tratamentos e no grupo controle, segundo as normas do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro. Com isto pretendeu-se identificar quais

compostos químicos são encontrados na água utilizada e, através da comparação com trabalhos realizados na área, identificar quais alterações foram geradas pelos contaminantes previamente estudados ou pela interação com outros elementos eventualmente presentes na água. A determinação de metais se deu por ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry* - Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente) para os seguintes elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions F⁻, Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, ClO₂⁻, acetato e oxalato, e os cátions Li, Na, NH₄⁺ e K, foram determinados por Cromatografia Iônica. Por fim, foram realizadas as análises de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

6.2. Rastros branquiais

a) Análises histológicas e histoquímicas

Após o tratamento, os arcos branquiais direito e esquerdo dos peixes foram retirados. Parte do material foi fixado em Bouin aquoso para reações em Hematoxilina – Eosina (H.E.), para a análise de possíveis alterações na morfologia do órgão, e em PAS e em Azul de Alcian (Alcian Blue) pH 1,0 e 2,5, para detecção das células de muco. Outra parte das amostras foi fixada em formaldeído 10%, para reação de Von Kossa, para a visualização das células ricas em mitocôndria (células de cloro) segundo Pereira & Caetano (2009).

Posteriormente à fixação, o material foi desidratado em soluções de álcool 70%, 80%, 90% e 95% durante 40 minutos cada banho. Então, foi transferido para uma solução de resina de embebição Leica®, por 48 horas e mantido em geladeira. O Na sequência foi, então, colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. Após a polimerização da resina, o material foi seccionado em 7 µm de espessura com auxílio do micrótomo Leica RM2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram submetidas às técnicas histológicas e montadas em entellan. Os protocolos das técnicas utilizadas constam no anexo 1.

b) Análise ultramorfológica

Para esta técnica, as brânquias foram fixadas em Karnovsky (Paraformaldeído 0,5M, Glutaraldeído 0,25M, Tampão Cacodilato de Sódio 0,1M) e desidratadas em acetona em concentrações crescentes de 50% a 100%, em banhos de 5 minutos. Após a desidratação, o material passou pelo ponto crítico (Balzers® CPD 030) para finalizar o processo de desidratação, e depois foi colado em *stubs* com fita dupla face. Os *stubs* foram levados ao metalizador (Balzers SCD 050) para receber cobertura de carbono e ouro, e por fim, observado. Foram analisados 3 rastros branquiais por indivíduo, os quais permitiram verificar qualitativamente alterações nos padrões de organização do tecido e das células de muco.

c) Análise morfofisiológica e contagem de células de muco

Alguns parâmetros utilizados na histologia e na histoquímica foram quantificados nos três grupos experimentais, ao passo que outros só puderam ser analisados qualitativamente.

As análises histológicas foram realizadas em 8 cortes longitudinais de 7 μm de espessura cada um, separados em duas lâminas (4 cortes por lâmina) e, em 2 arcos branquiais por indivíduo por se tratar de um número considerável de técnicas.

Como os peixes estavam em estado juvenil, os rastros se encontravam em tamanhos reduzidos e em baixa quantidade. Por este motivo, as contagens de número de células de muco foram realizadas em 5 rastros de, aproximadamente, mesmo tamanho por indivíduo, localizados entre as extremidades e a porção mediana do arco branquial (figura 3.1), pois foi o local onde eles estavam maiores e mais bem definidos.

A fim de reduzir erros de medidas, foram quantificados apenas rastros com comprimento entre 150 e 350 μm (do centro da base até o centro do ápice dos rastros), sendo que o comprimento médio foi de 262 μm (figura 3.1). Os rastros foram medidos por meio do programa Leica Application Suite (LAS) V3.7. As contagens do número de células de muco foram submetidas à análise estatística, passando primeiramente pelo teste Shapiro-Wilk para normalidade e, posteriormente, pelo teste não-paramétrico de comparação de médias Kruskal-Wallis/Dunn no software BioEstat® 5.0 ($\alpha = 0,05$).



Figura 3.1. Vista geral dos rastros branquiais do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS. As regiões delimitadas em vermelho indicam as porções do arco que foram utilizadas na análise e a seta de ponta dupla indica o local onde foi medido o comprimento dos rastros branquiais. Fonte: dados da pesquisa.

6.3. Fígado

a) Quantificação de lipofuscina

Para esta análise, fragmentos do fígado dos espécimes foi fixado em formalina 10%, segundo Junqueira & Junqueira (1983), os quais foram desidratados em soluções de álcool 70%, 80%, 90% e 95% durante 60 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de resina de embebição Leica® por 48 horas e mantido em geladeira. O material foi, então, colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. Após a polimerização da resina, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica RM2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram montadas em entellan sem coloração.

Segundo Melendi et al. (2005), a lipofuscina pode ser observada nas técnicas de H.E. e PAS como pontuações intracitoplasmáticas de cor pardo-amarelada. Entretanto, assim como já descrito aqui, a lipofuscina possui a propriedade de autofluorescência, razão pela qual cortes, sem coloração, foram analisados ao microscópio de fluorescência Olympus – BX51 e fotografados no software DP – Controller, sob o filtro de luz de 450 – 490 nm, segundo Peixoto et al. (2002).

Para a análise da variação de lipofuscina nos tecidos estudados, foram obtidas 10 fotos do fígado de cada indivíduo a partir de 5 cortes longitudinais com 7 µm de espessura cada. As imagens obtidas foram analisadas no programa ImageJ® versão 1.46e, no qual os grânulos de lipofuscina foram isolados e sua área total foi quantificada (figura 3.2). Com isso foi possível identificar a quantidade de lipofuscina presente em cada fragmento de tecido observado. Desta forma, os dados de área gerados pelo programa ImageJ foram tabelados e com estes, calculou-se a média de lipofuscina encontrada em cada indivíduo. Para identificar a existência de variação entre os dados, aplicou-se os mesmos testes de normalidade e comparação de médias usados para os rastros branquiais.

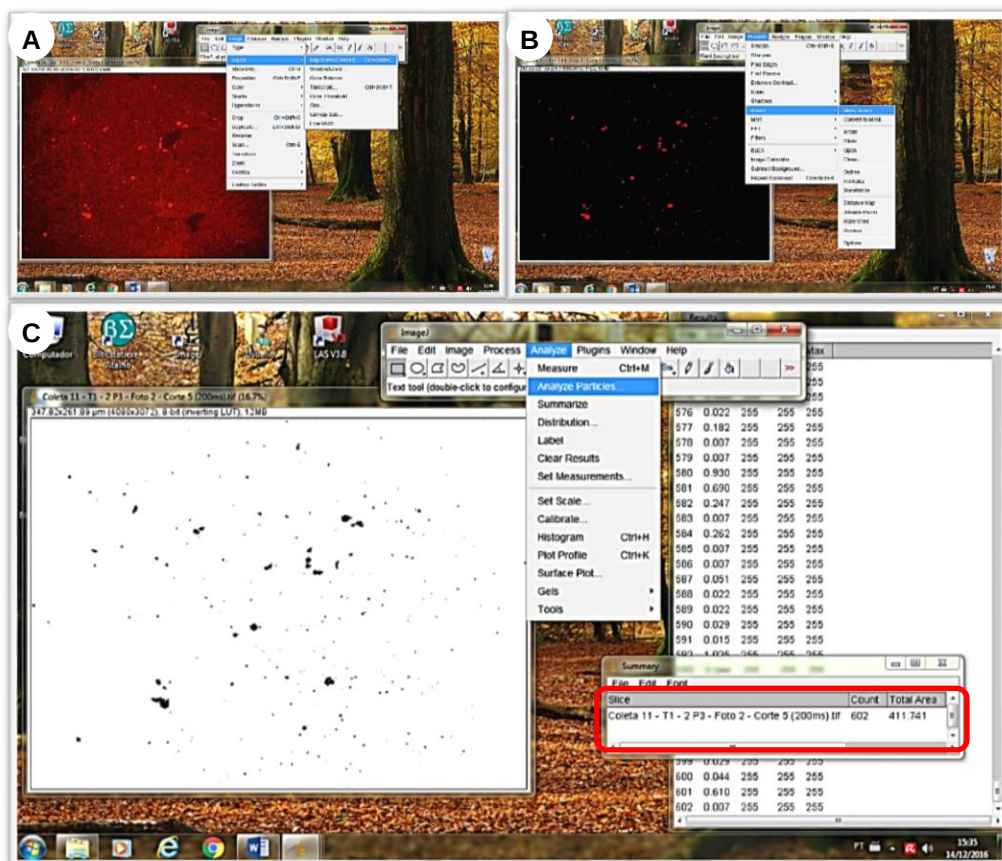


Figura 3.2. A a C. Vista geral das janelas de trabalho, em sequência, do software ImageJ mostrando parte do procedimento de isolamento dos grânulos de lipofuscina e sua quantificação (retângulo vermelho). Fonte: elaborado pelo autor.

b) Análise da expressão gênica

Extração de RNA

Fragmentsos do fígado foram coletados e, em seguida, lavados em solução tampão fosfato salino (PBS 1x - NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2,0 mM) e armazenados em freezer a -80° C. Para a extração de RNA, fragmentos de fígado de 3 indivíduos por grupo foram realizados, utilizando-se 0.03 g de cada uma das amostras, respeitando os diferentes tratamentos e tempos de exposição ao LAS. Então, as amostras foram ressuspensas em 600 µL de *Trizol Reagent®* (*Thermo Fisher Scientific – Life Technologies*), homogeneizadas com auxílio de homogeneizador de tecidos (*Uniscience*) com rotação contínua de 12.000 rpm. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. Coletaram-se os sobrenadantes e a estes foram adicionados 120 µL de clorofórmio (*Sigma-Aldrich®*). A mistura foi homogeneizada vigorosamente por 30 segundos e, depois, foi mantida à temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, realizou-se nova centrifugação de 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (fase aquosa) foi coletado e transferido para um novo tubo, cuidadosamente, para evitar contaminação da fase fenólica. Novamente, o material foi levado à centrífuga por 10 minutos a 12.000 g e 4°C. Foi adicionado 300 µL de isopropanol, seguido de homogeneização suave e de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos e de nova centrifugação (10 minutos, a 12.000 g a 4°C). Retirado o sobrenadante, o precipitado recebeu 400 µL de álcool 75% e, posteriormente, foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 4°C. Então, após a remoção do álcool, as amostras foram secas à temperatura ambiente e ressuspensas em 30 µL de água DEPC (*Diethylpyrocarbonate - UltraPure DEPC-treated Water*). O RNA extraído foi analisado em *NanoVue™ Plus* (*GE Healthcare*), considerando a razão de pureza A260/A280nm ≥ 1.8 para seleção das amostras utilizadas nas mensurações da expressão gênica.

Transcrição reversa

Após a extração do RNA total, foi realizada a transcrição reversa para a obtenção do DNA complementar (cDNA), utilizando o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (*Thermo Fisher Scientific - Life Technologies*). Foi pipetado um volume

final de 10 μ L, sendo utilizado 1 μ g de RNA total de cada amostra nas reações, 10 mM de oligonucleotídeos (10x *RT Random primer*), 10 mM de dNTPs (25x dNTP), 1,25 U da enzima *Multi Script™ Reverse Transcriptase* e água livre de RNase. A síntese do cDNA foi realizada utilizando ciclagem apropriada do fornecedor da enzima.

Em seguida, para se avaliar a eficiência da transcrição reversa, foram realizadas Reações em cadeia da polimerase (PCR) convencionais, utilizando os oligonucleotídeos do gene β -actina como normalizador. Assim, após a síntese dos cDNAs, reações de PCR foram processadas em um volume final de 15 μ L, utilizando 2 μ L do cDNA (1:10), 10 μ M de oligonucleotídeos direto e reverso, 1,5 mM de $MgCl_2$, solução tampão para PCR (1 X), 250 μ M de dNTP e 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (*Thermo Fisher Scientific Inc.*), adaptando-se metodologia descrita por Ausubel et al. (1995). As reações foram realizadas em triplicatas e processadas em termociclador *Mastercycler pro S®* (*Eppendorf*). Para a análise dos resultados, os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. A figura 3.3 apresenta os resultados.

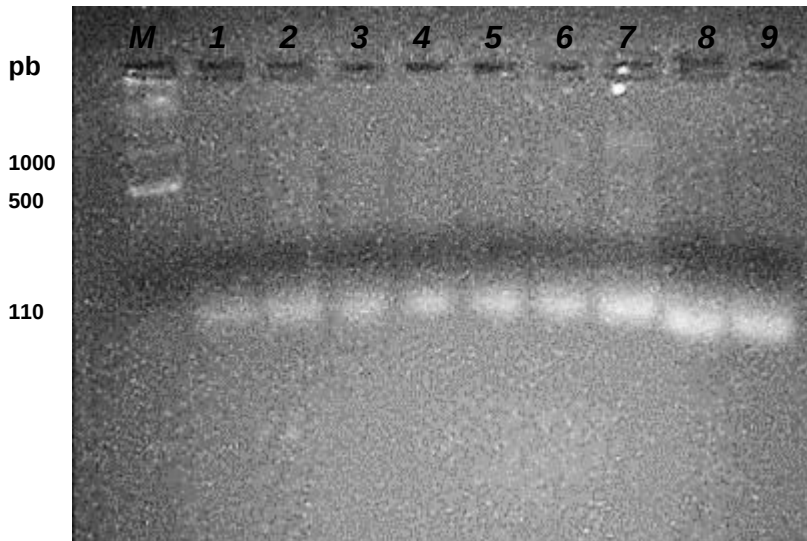


Figura 3.3. Análise do produto transcrricional do gene β -actina 0.3 kB, obtido por extração do RNA total em gel de agarose 2%. **M.** Marcador de peso molecular. **1.** Controle - 14 dias. **2.** 0.36 mg/L - 14 dias. **3.** 3.6 mg/L - 14 dias. **4.** Controle - 21 dias. **5.** 0.36 mg/L - 21 dias. **6.** 3.6 mg/L - 21 dias. **7.** Controle - 30 dias. **8.** 0.36 mg/L - 30 dias. **9.** 3.6 mg/L - 30 dias. Fonte: dados da pesquisa. pb = pares de bases

Análises transcrricional de genes em reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Para as reações de Polimerização em Cadeia Quantitativa (qPCR) foi utilizado o aparelho *StepOne Plus™ Real-Time PCR System – Life Technologies*, utilizando-se

o modo de análise baseado no Ct ($\Delta\Delta C_t$) para uma comparação de quantificação relativa.

Sequências de oligonucleotídeos para o gene 555506, análogo ao gene transportador ABCA4 (*ATP-binding cassette*, subfamília A4), e para o gene de referência β -actina, foram desenhadas anteriormente (Tabela 1) pelo, até então, doutorando Bruno Fiorelini Pereira (ex-orientando do prof. Dr. Flávio Henrique Caetano - processo FAPESP nº 2009/17118-9 - e atual professor da Universidade Federal do Oeste da Bahia), quando em seu estágio no laboratório do Prof. Dr. Paulino Martínez Portela na Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Para melhor elucidar, *ATP-binding cassette* (ABC) é uma superfamília de genes que codificam proteínas transportadoras envolvidas com translocação de substratos através de membranas (HIGGINS, 1992), na qual a subfamília do gene ABCA4 se insere e, de acordo com estudos de Cideciyan et al. (2004), está relacionado com o acúmulo de lipofuscina.

Baseado nessas análises, oligonucleotídeos degenerados para os genes 555506 e β -actina foram desenhados e utilizados na amplificação de sequências de cDNA em reações de qPCR. As sequências dos respectivos oligonucleotídeos (*primers*) se encontram descritas na tabela abaixo:

Tabela 1. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de qPCR. Fonte: Pereira, 2014.

Gene	Direto	Reverso
β - Actina	5' - CCATCTCCTGCTCGAAGTC	5' - CACTGCCCATCTACGAG
555506	5' - CGCCATGAATCACCTCTGAA	5' - GGACATGGCGAAAATGACACA

7. Resultados

Os dados de coletas em duplicata foram analisados em conjunto, pois apresentaram resultados similares.

7.1. Análise química da água utilizada

As análises químicas da água utilizada não mostraram grandes diferenças nos valores das concentrações de quase todos os parâmetros testados; alguns íons/elementos estavam elevados nas amostras de diluição de LAS: SO_4^{2-} (13.7 mg/L)

nas diluições de 0.36 mg/L e alumínio (0.080 mg/L e 0.052 mg/L, Tratamento 1 e 2, respectivamente) em ambas as concentrações de LAS. Apenas o Cl^- (44.2 mg/L) estava elevado nas amostras do controle.

Os relatórios que listam tais resultados, bem como a análise completa da água, constam no anexo 3 ao final deste documento.

7.2. Rastros branquiais

7.2.1. Morfologia dos rastros branquiais

Os rastros de *P. lineatus* são constituídos principalmente de tecido conjuntivo, o qual repousa sobre o pericôndrio, que, por sua vez, está sobre o tecido cartilaginoso do arco branquial. Eles são recobertos em sua totalidade por tecido epitelial pavimentoso pluriestratificado, contendo células mucosas, corpúsculos gustativos e células ricas em mitocôndria (figura 4.1).

O grupo controle, durante as 3 coletas de experimento, apresentou estrutura tecidual consistente, com corpúsculos gustativos, tecido conjuntivo frouxo, tecido cartilaginoso e poucas células de muco (figura 4.1 - A a C).

Em ambos os grupos expostos, após 14 dias de experimento, pôde ser observado aumento significativo no número de células de muco, o que ficou mais evidente ainda no grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS (análise detalhada no item 7.2.2), no entanto, não foram observadas mudanças morfológicas conspícuas (figura 4.1 – D e G).

Já com 21 dias de experimento, o grupo exposto a 0.36 mg/L não apresentou alterações, enquanto que no grupo exposto a 3.6 mg/L, observou-se hiperplasia (figura 4.1 – E e H). Após 30 dias de exposição, houve perda de integridade do epitélio, apresentando também hiperplasia (figura 4.1 – F e I).

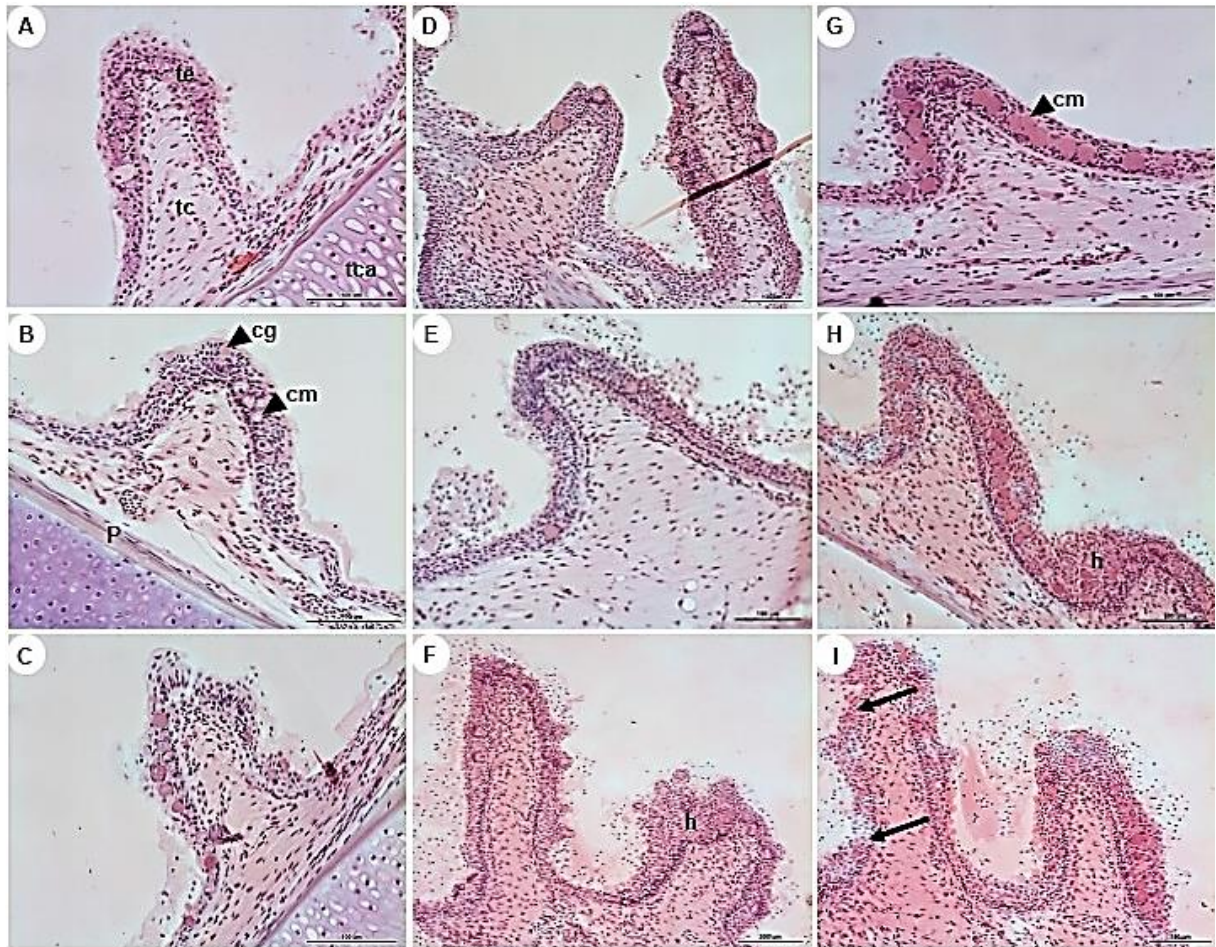


Figura 4.1. A a C. Rastros branquiais do grupo controle após 14, 21 e 30 dias, respectivamente. D a F. Rastros branquiais do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS (14, 21 e 30 dias respectivamente). Observe a hiperplasia (h) em F. G a I. Rastros branquiais do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS (14, 21 e 30 dias respectivamente). Note a hiperplasia (h) em H e a alteração na integridade do epitélio (setas) em I. Legenda: células de muco (cm), corpúsculo gustativo (cg), pericôndrio (p) tecido cartilaginoso (tca), tecido conjuntivo (tc) e tecido epitelial (te). Técnica: H.E.

7.2.2. Contagem de células de muco

a) Técnica de PAS

Esta técnica detecta polissacarídeos neutros e foi utilizada na identificação de células de muco, as quais foram evidenciadas como marcações de cor magenta no epitélio dos rastros branquiais (figura 4.2).

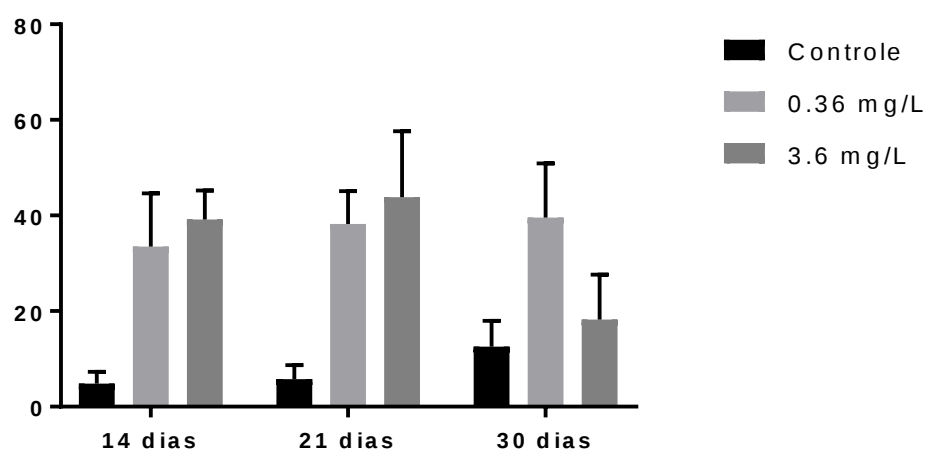
O grupo controle se manteve praticamente inalterado durante todo o experimento (figura 4.3 - A). Entretanto, os resultados mostraram um aumento significativo da quantidade de células de muco em ambos os grupos tratados logo a partir de 14 dias de exposição ao contaminante (tabela 2) em comparação ao grupo controle. Após 30 dias, apesar de ainda haver um elevado número de células mucosas entre os grupos tratados (figuras 4.3 – B e C), não houve diferença significativa entre

o grupo controle e o grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS, ou seja, observa-se redução do número de células mucosas neste grupo do tratamento em relação ao período anterior (Gráfico 1). Em geral, os dados apontaram para um aumento significativo da quantidade de células mucosas nos grupos expostos ao LAS.

Tabela 2. Contagem de células mucosas. Médias, desvios padrão ($S\pm$) e intervalos de confiança (p). Primeira e segunda repetição do experimento.

	Controle		0.36 mg/L		p	3.6mg/L		p
	Média	$S\pm$	Média	$S\pm$		Média	$S\pm$	
14 dias	4.86	2.41	33.47	11.15	<0.05	39.14	6.11	<0.05
21 dias	5.75	2.96	38.26	6.84	<0.05	43.80	13.86	<0.05
30 dias	12.59	5.36	39.57	11.31	<0.05	18.22	9.41	ns

Gráfico 1. Quantidade média de células mucosas nos rastros branquiais. Técnica de PAS.



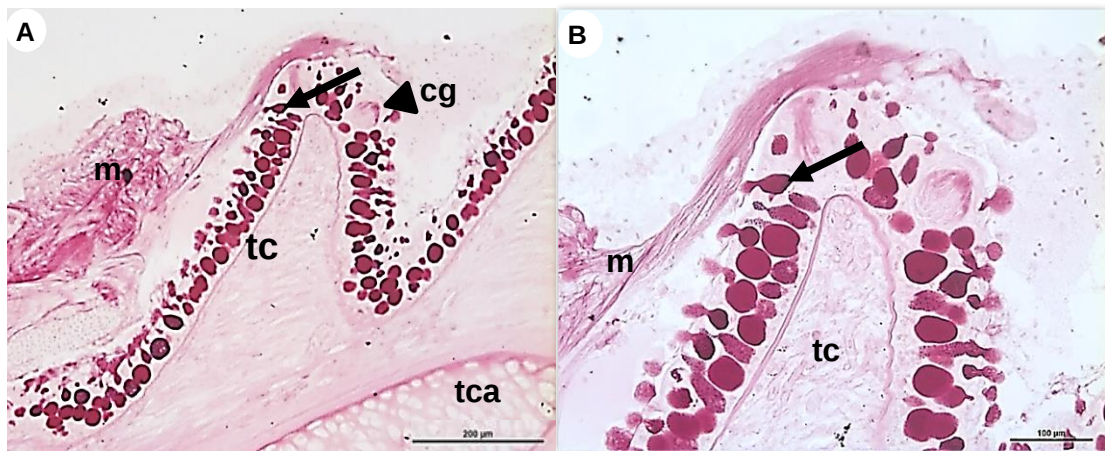


Figura 4.2. A. Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 30 dias de experimento. B. Detalhe das células mucosas da micrografia ao lado (A). Note a marcação de células mucosas liberando seu conteúdo (seta). Legenda: células mucosas (setas), muco liberado (m), corpúsculo gustativo (cg), tecido cartilaginoso (tca), tecido conjuntivo (tc). Técnica de PAS.

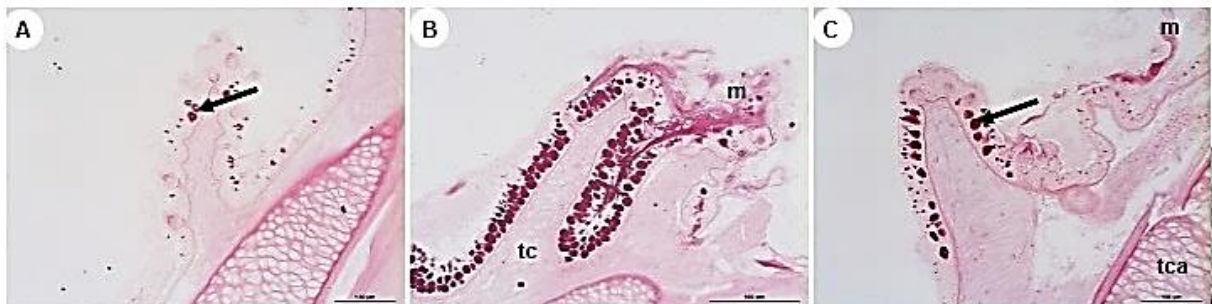


Figura 4.3. Rastros após 30 dias de tratamento. A. Rastro branquial do grupo controle. B. Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS. Note a grande quantidade de células mucosas acompanhadas de hipersecreção de muco. C. Rastro branquial do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS. Observe a diminuição das células mucosas em relação à micrografia B, entretanto ainda um pouco elevado em comparação à figura A. Legenda: células mucosas (setas), muco liberado (m), tecido cartilaginoso (tca), tecido conjuntivo (tc). Técnica de PAS.

b) Técnica de Alcian Blue (pH 2,5 e 1,0)

Esta técnica evidencia polissacarídeos ácidos e foi utilizada na identificação de células de muco ácido, as quais foram identificadas como marcações de cor azul celeste no epitélio dos rastros branquiais (figura 4.4).

Em pH 2,5, esta técnica foi analisada qualitativamente na 2ª repetição, pois não houve número amostral suficiente de rastros branquiais e de indivíduos na 1ª repetição; já em pH 1,0, as células não foram marcadas com a técnica.

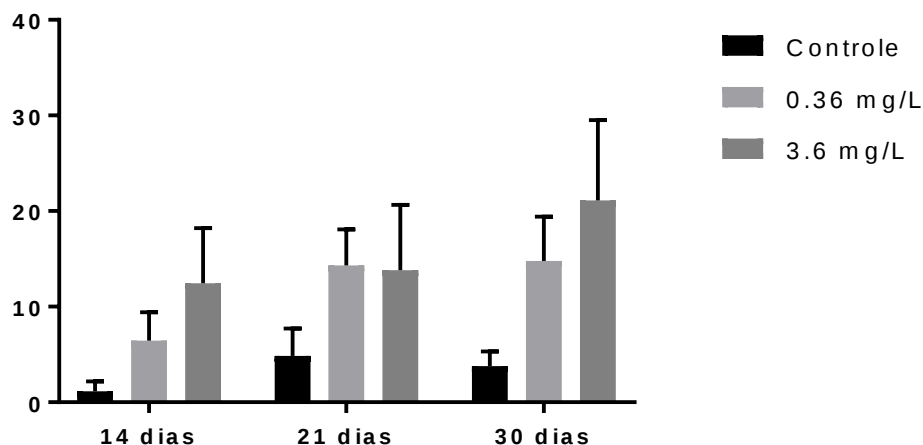
Embora o número amostral não tenha sido atingido devido à falta de material, em pH 2,5, 3 indivíduos por grupo foram analisados e os resultados encontrados se aproximam dos resultados encontrados por meio da técnica de PAS deste estudo. Notou-se um aumento gradativo em células mucosas nos grupos tratados (tabela 2).

O grupo controle apresentou poucas células de muco ao longo dos 30 dias (figura 4.4 - A), ao passo que os grupos tratados apresentaram um aumento destas mesmas células logo nos primeiros 14 dias (tabela 2). A maior quantidade de células mucosas foi encontrada no grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 30 dias de experimento (gráfico 2).

Tabela 3. Contagem de células mucosas Médias, desvios padrão ($S\pm$) e intervalos de confiança (p). Segunda repetição do experimento.

	Controle		0.36 mg/L			3.6mg/L		
	Média	$S\pm$	Média	$S\pm$	p	Média	$S\pm$	p
14 dias	1.16	1.02	6.45	2.98	<0.05	12.45	5.77	<0.05
21 dias	4.86	2.87	14.33	3.74	<0.05	13.83	6.83	<0.05
30 dias	3.77	1.56	14.77	4.66	<0.05	21.10	8.41	<0.05

Gráfico 2. Quantidade média de células mucosas nos rastros branquiais. Técnica de Alcian Blue (pH 2,5).



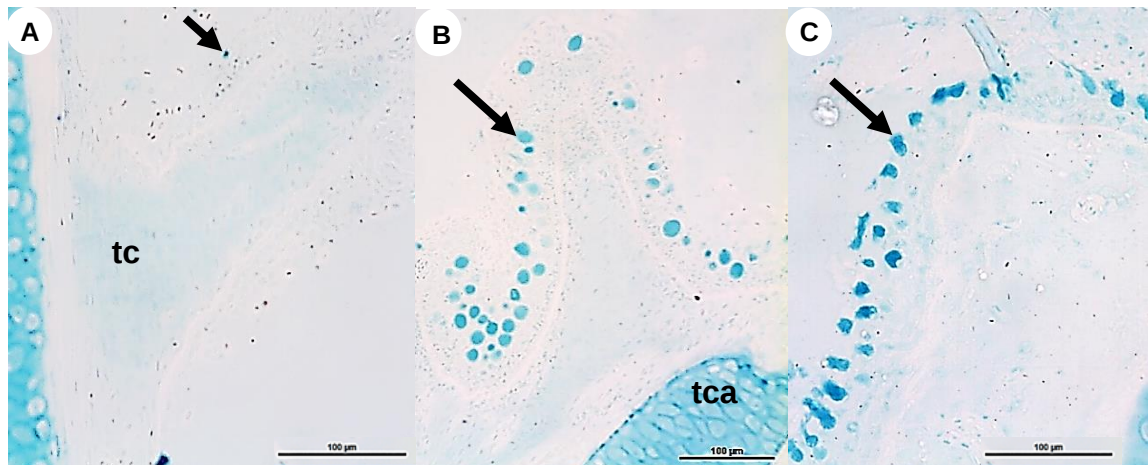


Figura 4.4. Rastros após 30 dias de tratamento. **A.** Rastro branquial do grupo controle. **B.** Rastros branquiais do grupo expostos a 0.36 mg/L de LAS. **C.** Rastro branquial do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS. Legenda: células mucosas (setas), tecido conjuntivo (tc). Técnica de PAS.

c) Técnica de Von Kossa

Marcações de células ricas em mitocôndrias não foram detectadas com esta técnica, entretanto, foi possível observar a presença de cálcio em células mucosas, as quais foram identificadas como marcações de cor marrom, variando de marrom claro à marrom escuro, ao longo do epitélio.

Ao longo dos 30 dias de experimento, o grupo controle apresentou reação fracamente positiva nesta técnica com pouca ou nenhuma marcação (figura 4.5 – A e B). Já os grupos expostos a 0.36 mg/L e a 3.6 mg/L de LAS apresentaram marcações variando de moderada a forte ao longo do tratamento (figuras 4.5 – C a F).

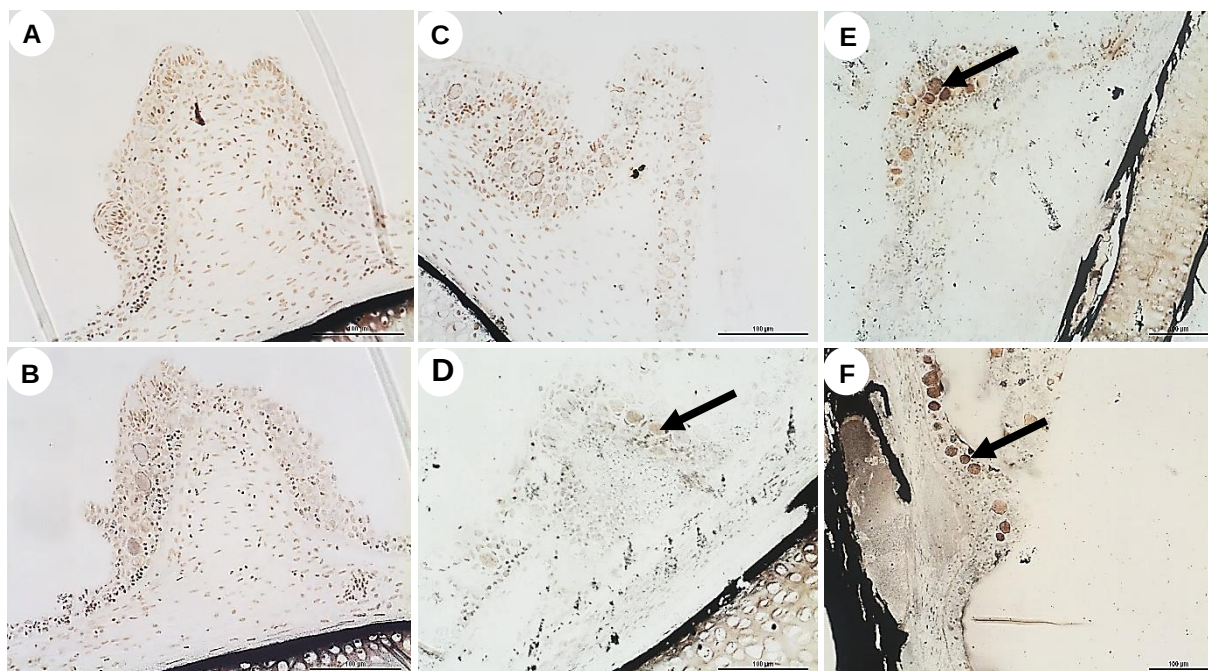


Figura 4.5. A e B. Rastros branquiais do grupo controle após 21 e 30 dias, respectivamente. C e D. Rastros branquiais do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 21 e 30 dias, respectivamente. E e F. Rastros branquiais do grupo exposto a 3.6 mg/L após 21 e 30 dias, respectivamente. Observe a intensidade da cor das células de muco (setas) comparada às figuras C e D. Técnica de Von Kossa.

7.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise ultramorfológica revelou rastros branquiais pequenos, relativamente esparsos e em pouca quantidade (figura 4.6 - A). Além disso, ficou evidente a grande quantidade de corpúsculos gustativos encontrados na superfície do epitélio tanto no grupo controle quanto nos grupos tratados (figura 4.6 - B). Trata-se de protuberâncias dispostas ao longo do rastro branquial, voltados para a cavidade bucofaringeana e seus ápices são preenchidos por receptores.

O epitélio dos rastros branquiais é formado por células pavimentosas com formato poligonal, sendo encontradas em tamanhos variados. Estas células possuem, em sua superfície, microsaliências concêntricas na membrana celular, chamadas de microcristas (figura 4.6 – D). Além disso, por se tratar de superfície, apenas a região apical das células de muco é observada no órgão em questão, devido ao seu formato, à forma de inserção no epitélio e à forma de liberação de muco, que é apócrina. A região apical aparece entre as células pavimentosas e é por onde o muco é liberado, o qual se ancora nas microcristas. Entretanto, a região apical das células que é observável será referida no texto diretamente como célula de muco.

Em relação às alterações morfológicas, o grupo controle se manteve praticamente inalterado ao longo do experimento (figura 4.6 – C).

Após 14 dias de experimento, não houve alterações quanto à forma das células pavimentosas em ambos os grupos expostos ao detergente em comparação ao controle; mas já pudemos observar aumento qualitativamente significativo no número células de muco (figura 4.7 – A e B).

Após 21 dias de exposição, além do aumento do número de células de muco em ambos os grupos expostos ao LAS, pôde ser observado descaracterização do epitélio (figura 4.7 – C e D).

O último tempo (30 dias) revelou uma descaracterização estrutural dos rastros em ambos os grupos tratados, porém mais evidente no grupo exposto a 3.6 mg/L (figura 4.7 – E e F), o que também foi demonstrado pela técnica histológica. Essa alteração estrutural se repetiu muitas vezes entre os grupos tratados, o que não foi observado no grupo controle. Além disso, observamos também hipersecreção de muco, que algumas vezes encobria os próprios corpúsculos gustativos (figura 4.8 – A e B).

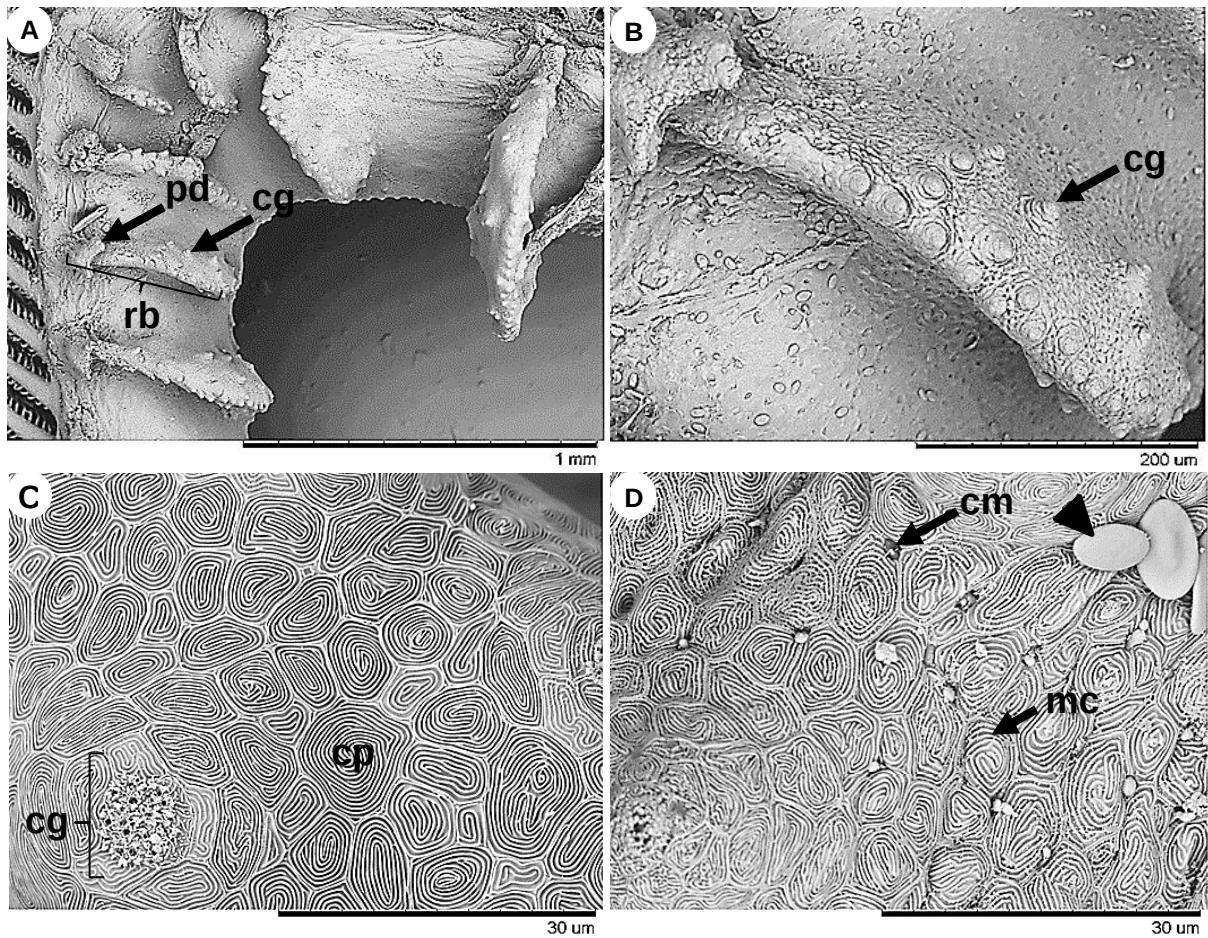


Figura 4.6. **A.** Vista geral do arco branquial do grupo controle. **B.** Detalhe dos corpúsculos gustativos (cg) do rastro branquial exemplificado na micrografia ao lado (B). Note a grande quantidade de corpúsculos gustativos. **C.** Rastro Branquial do grupo controle após 14 dias. **D.** Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 14 dias. Note a maior quantidade de células de muco em comparação à figura C. Legenda: célula pavimentosa (cp), hemácia (cabeça de seta), microcrista (mc), corpúsculo gustativo (cg), processo digitiforme (pd), região apical de célula de muco (cm) e rastro branquial (rb). Técnica de MEV.

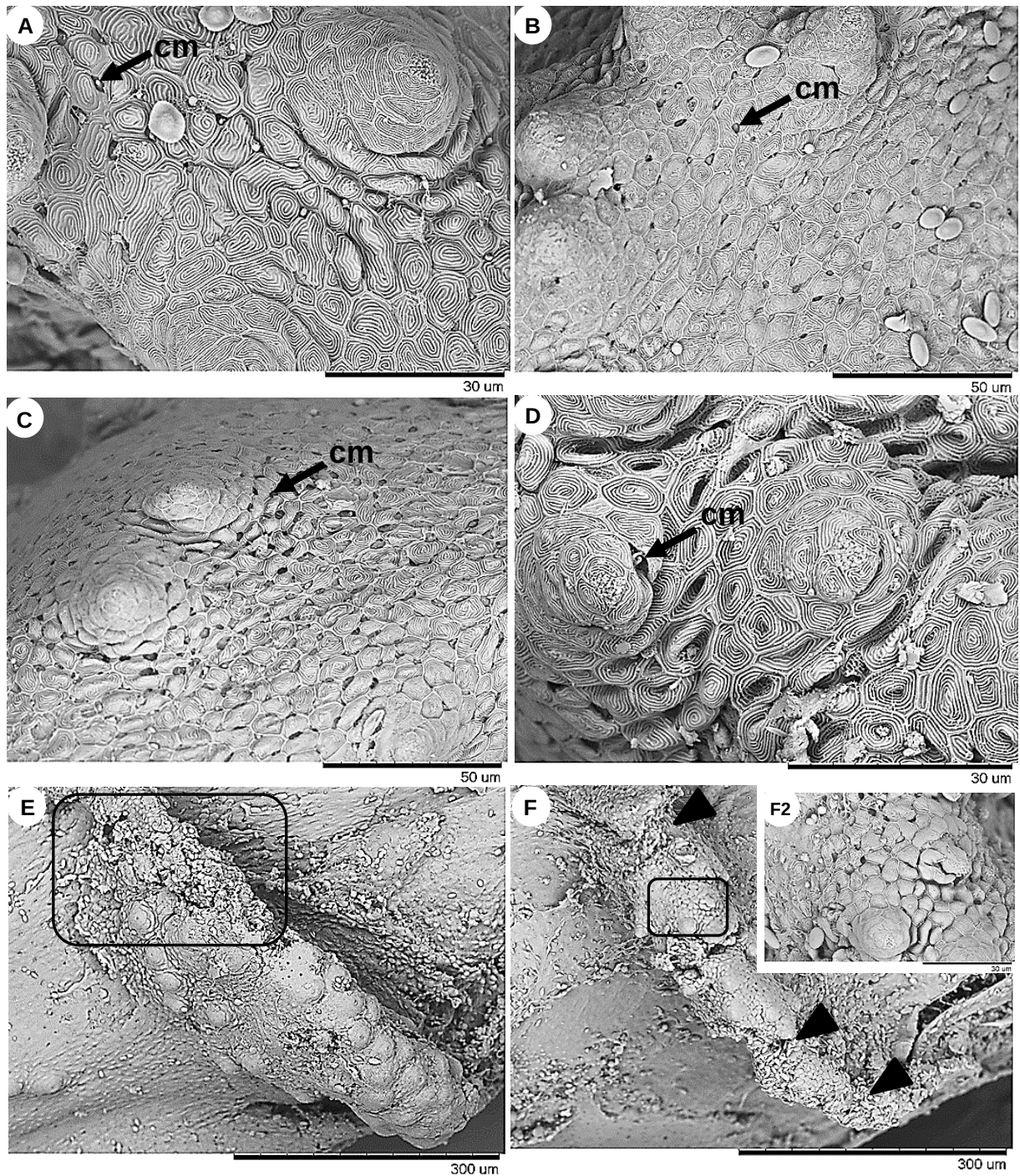


Figura 4.7. **A.** Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 14 dias. **B.** Rastro branquial do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 14 dias. Note o aumento de células de muco (cm). **C.** Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 21 dias. Observe a alta quantidade de células mucosas. **D.** Rastro branquial do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 21 dias. **E.** Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 30 dias. Note a descaracterização do epitélio (região em destaque). **F.** Rastro branquial do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 30 dias. Observe a descaracterização do epitélio (cabeças de seta). **F2.** Detalhe da área destaca na figura 4.7 - F. Veja a perda de arquitetura e estrutura do epitélio. Legenda: célula de muco (cm) Técnica de MEV.

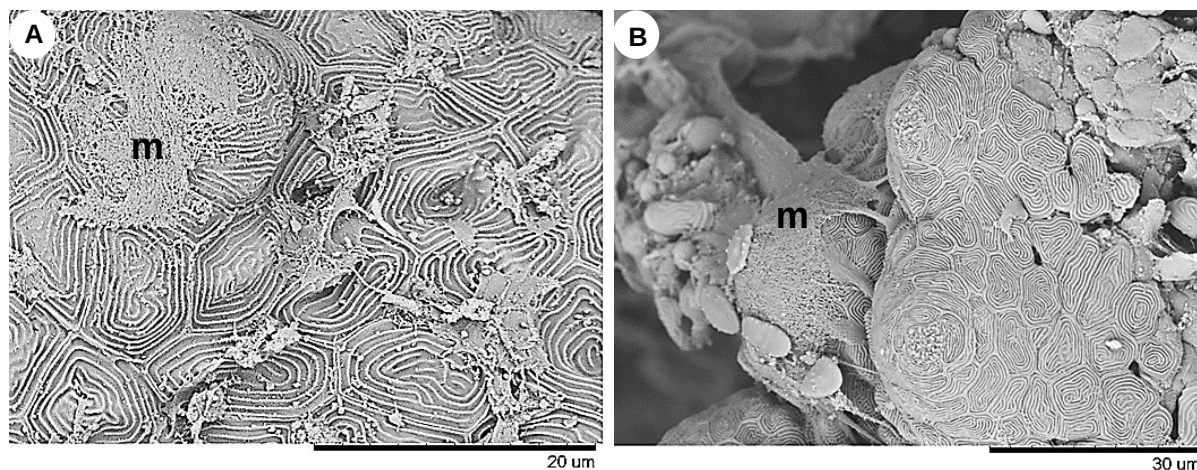


Figura 4.8. **A.** Rastro branquial do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 30 dias. Observe a hipersecreção encobrindo um corpúsculo gustativo. **B.** Rastro branquial do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 30 dias. Note novamente a hipersecreção (m) encobrindo outro corpúsculo gustativo. Técnica de MEV.

7.3. Fígado

7.3.1. Quantificação de lipofuscina

Os grânulos de lipofuscina foram identificados como pontuações citoplasmáticas fluorescentes vermelhas. Foram observadas algumas marcações similares nos eritrócitos devido a sua autofluorescência. Entretanto, tais marcações foram desconsideradas nas análises.

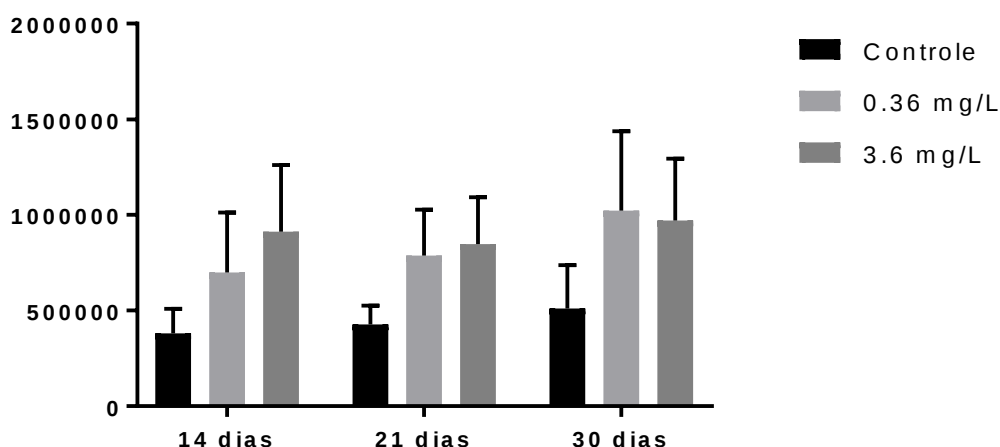
Nestes experimentos, o grupo controle apresentou quantidades crescentes de marcações do pigmento da lipofuscina proporcionalmente ao aumento do tempo (figura 4.9 – A a C), embora ainda significativamente menor em relação aos grupos tratados (gráfico 3).

Tabela 4. Médias em μm^2 da área ocupada pela lipofuscina no fígado. Médias, desvios padrão ($S\pm$) e intervalos de confiança (p). Note a maior presença de lipofuscina nos grupos expostos ao detergente durante todo o experimento.

	Controle			0.36 mg/L			3.6 mg/L		
	Média	S±		Média	S±	p	Média	S±	P
14 dias	381603.9	128107.8		699345.1	312653.0	ns	913284.5	347740.0	< 0.05
21 dias	427403.5	98771.8		786900.4	241256.9	< 0.05	846842.4	246137.4	< 0.05
30 dias	510132.5	227724.9		1022159.7	416031.3	< 0.05	971316.8	322763.7	< 0.05

Os primeiros 14 dias de exposição deixaram evidências de aumento da

Gráfico 3. Médias em μm^2 da área ocupada pela lipofuscina no fígado



quantidade de grânulos de lipofuscina em ambos os grupos expostos ao poluente (figura 4.9 – D e G) em comparação ao grupo controle, embora, como podemos observar na tabela acima, este aumento foi significativamente maior apenas no grupo exposto à maior concentração do LAS.

Em contrapartida, aos 21 dias de experimento houve aumento considerável da área ocupada pela lipofuscina em ambos os grupos tratados (tabela 3), resultado este que se manteve significativo também após 30 dias em contato com o contaminante (figura 4.9 – E a I).

Observamos também, além do aumento progressivo da quantidade de lipofuscina, superacúmulo desse pigmento principalmente ao redor de vasos sanguíneos, resultando em fortes colorações circulares (figura 4.10).

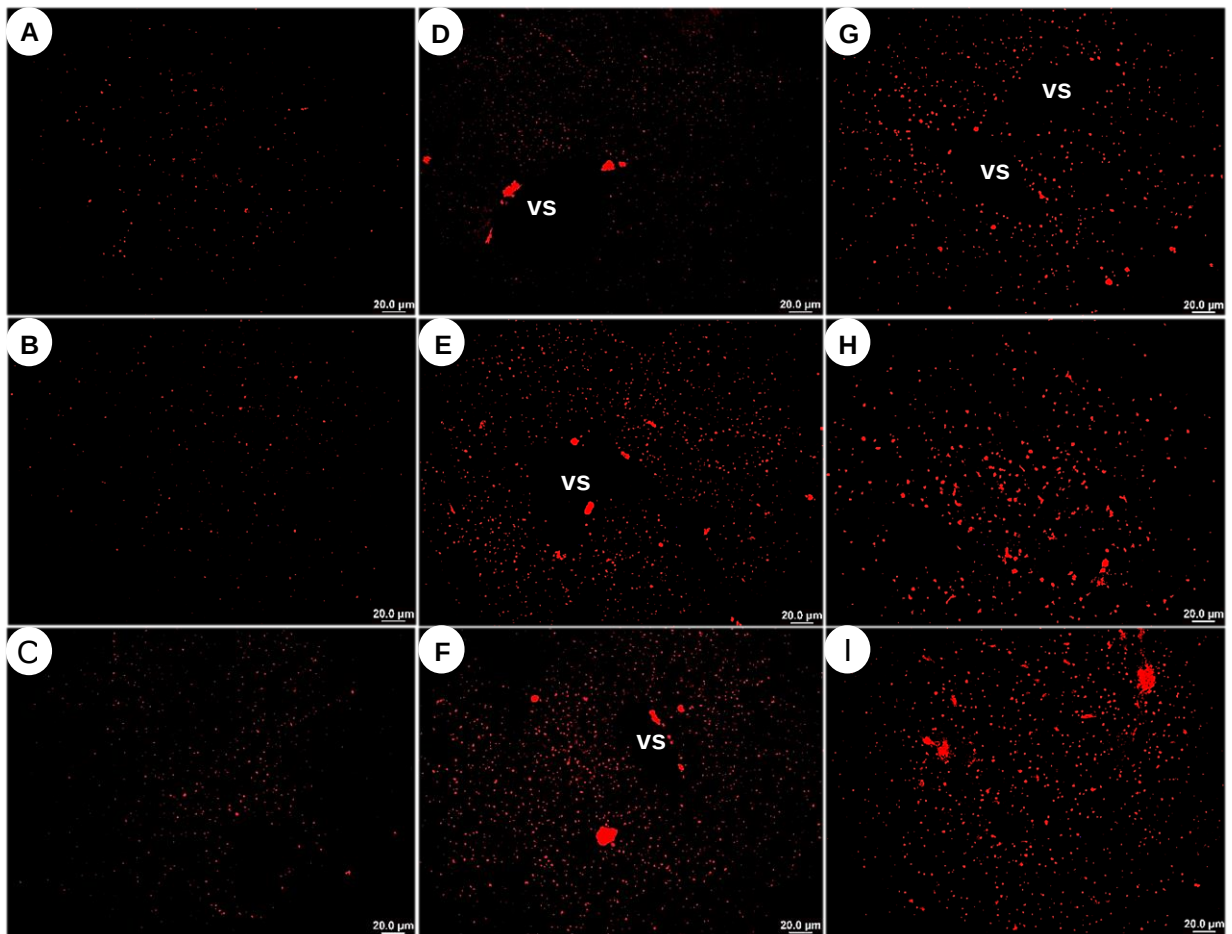


Figura 4.9. **A a C.** Fígado do grupo controle após 14, 21 e 30 dias de experimento, respectivamente. Note a baixa quantidade de grânulos de lipofuscina (pontos vermelhos). **D a F.** Fígado do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 14, 21 e 30 dias, respectivamente. Note o acúmulo maior de lipofuscina, bem como a concentração do pigmento ao redor dos vasos sanguíneos (vs). **G a I.** Fígado do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 14, 21 e 30 dias de tratamento, respectivamente. Observe a maior concentração de lipofuscina no tecido. Técnica de microscopia de fluorescência.

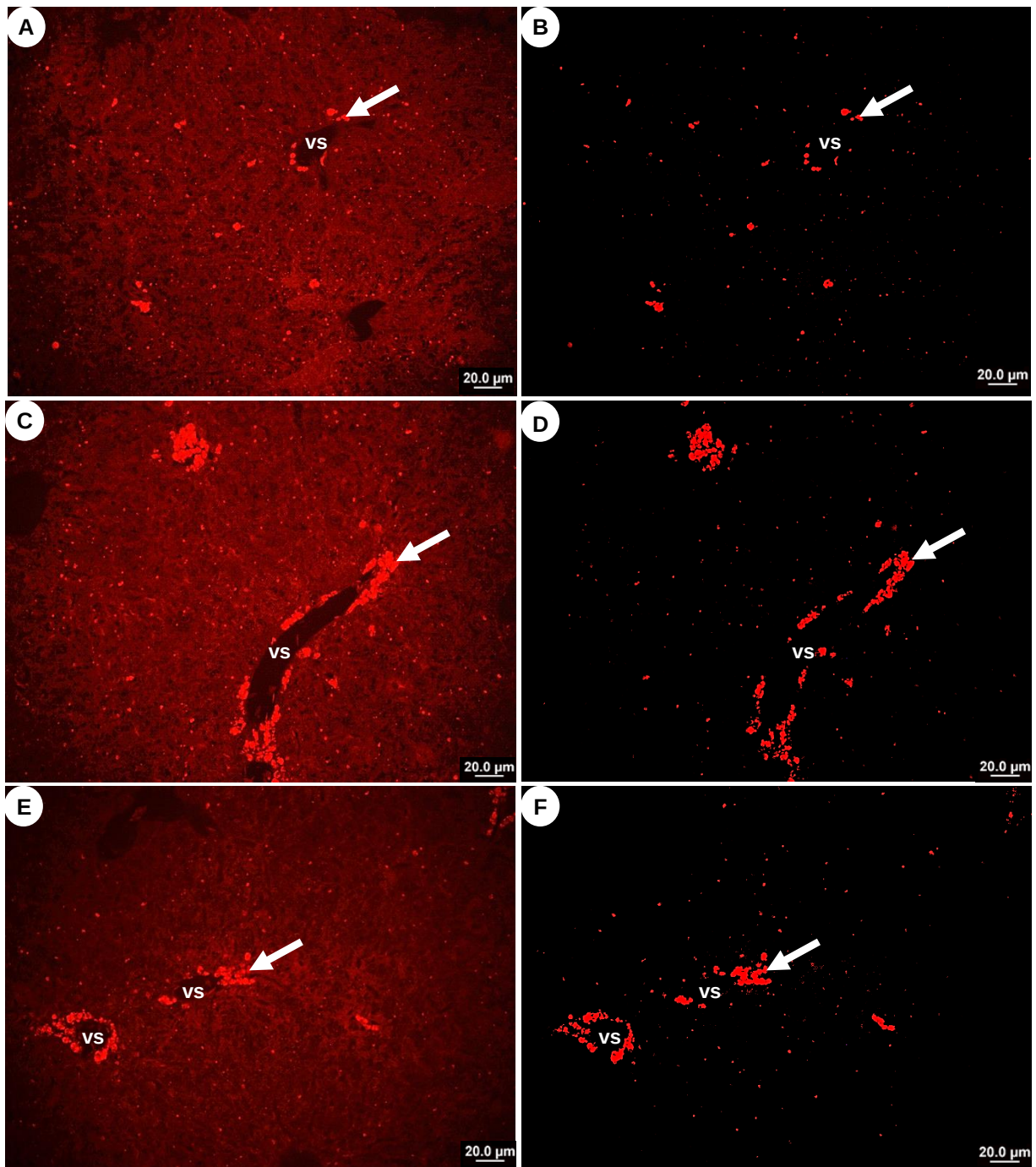
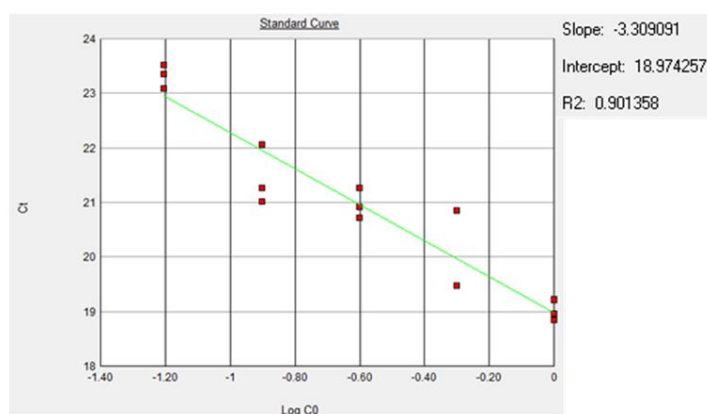


Figura 4.10. A e B. Fígado do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 21 dias de experimento. C e D. Fígado do grupo exposto a 3.6 mg/L de LAS após 21 dias de experimento. E e F. Fígado do grupo exposto a 0.36 mg/L de LAS após 30 dias de experimento. Observe o acúmulo maior de lipofuscina ao redor de vasos sanguíneos (setas). Técnica de microscopia de fluorescência.

7.3.2. Expressão gênica

Inicialmente foi construída a curva de amplificação padrão de cada oligonucleotídeo para se verificar a eficiência dos mesmos. Para tal, reações de amplificação utilizando-se os oligos, o reagente *SYBR®Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher Scientific- Applied Biosystems) e uma diluição seriada de cDNA de 6 pontos de amostras controles foram realizadas. Os resultados obtidos foram satisfatórios, pois apresentaram um coeficiente de correlação (R^2) da curva padrão ($R \geq 0.9$) e *slopes* variando entre -3,14 e -3,42. O gráfico 4 apresenta o resultado, para a amplificação e validação do gene da β -actina.

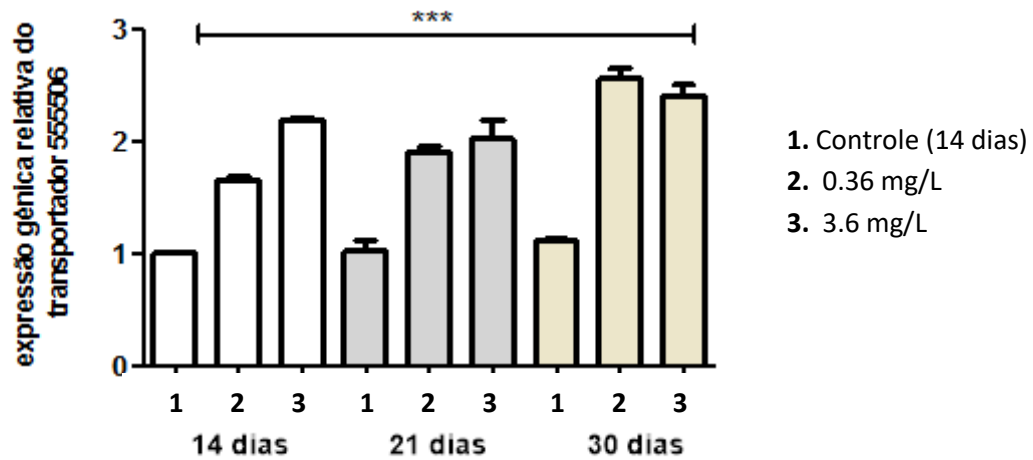
Gráfico 4. Curva padrão de amplificação do gene β -actina.



Legenda: em x estão demonstrados os valores de log da concentração de cDNA e em y, os valores de Ct correspondente a cada diluição. Os valores de *slope* do coeficiente de linearidade (R^2) estão representados à direita do gráfico. cDNA da condição controle foi utilizado em uma diluição seriada de 6 vezes.

Assim, considerando os resultados obtidos nas análises preliminares, ensaios de qPCR foram realizados para mensuração do gene 555506 no fígado, visando uma correlação da expressão gênica e os efeitos do LAS. O gráfico 5 apresenta os resultados obtidos.

Gráfico 5. Análise de expressão gênica usando PCR quantitativo (qPCR)



A análise dos resultados evidencia um padrão de expressão do gene 555506 similar ao observado para a lipofuscina em ensaios de microscopia de fluorescência. Observamos, portanto, um crescente estímulo na expressão do gene 555506 diretamente proporcional ao aumento do tempo de exposição e concentração de LAS.

8. Discussão

Os estudos histopatológicos são importantes para se verificar a sensibilidade de órgãos a substâncias tóxicas. Tais estudos podem ser utilizados como fonte de dados para determinar a qualidade da água e também a saúde dos peixes expostos a essas substâncias (PAULINO, 2011). Segundo Bernet et al. (1999), o grau das lesões está diretamente relacionado com seu potencial patológico, logo, a forma como a lesão afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência do animal é levada em consideração quando se trata de importância das lesões. A hiperplasia do epitélio dos rastros aos 21 dias de exposição tem fator de importância tipo 2 (escala de 1 a 3 – leve, moderado e grave, respectivamente), ou seja, moderado, e na maioria dos casos pode ser reversível. Para Bernet et al. (1999), é uma modificação proliferativa, por isso é progressiva e aumenta a quantidade e a atividade das células e do tecido, aumentando a distância entre a água os tecidos internos, criando assim uma barreira para a entrada dos agentes tóxicos (CAMARGO & MARTINEZ, 2007; MALLATT, 1985).

O quadro progrediu até os 30 dias de tratamento, com a perda de integridade do epitélio, o que Bernet et al. (1999) chamam de alteração na arquitetura e na estrutura do tecido, em ambos os grupos expostos ao contaminante. Para estes últimos autores, a alteração estrutural tem fator de importância tipo 1, sendo esta passível de recuperação quando retirado o contaminante. Entretanto, quando juntas e em grande extensão no órgão, essas alterações podem aumentar o valor de importância das lesões, o que resulta em um grau patológico também maior (BERNET et al., 1999). Pelo exposto, no caso deste estudo, a perda da estrutura do tecido e a descaracterização do epitélio, combinados com a extensão das lesões, agravaram mais o quadro patológico.

Um padrão de resposta similar pôde ser observado com as células de muco. Foi verificado o aumento da quantidade destas células logo nos primeiros dias de experimento nos leva a inferir alteração na fisiologia do órgão, pois o muco secretado por estas células pode contribuir tanto na obtenção do alimento, aglutinando-o, como também na proteção de células pavimentosas e na difusão de água e íons (FONSECA NETO & SPACH, 1999).

Os polissacarídeos neutros têm importante função na regulação iônica e osmótica, na excreção, locomoção, alimentação, entre outras funções (BERNET et

al., 1999). Além disso, principalmente o muco ácido (DUNCAN et al., 2010) desempenha um importante papel como barreira de proteção contra partículas, agentes patogênicos e compostos tóxicos nos peixes (BERNET et al., 1999). Estes dados da literatura corroboram os aqui demonstrados, o que nos indica uma reação dos organismos em resposta ao contaminante ao qual foram expostos. Segundo Zaccone et al. (2001), o aumento no número dessas células é uma reação comum à contaminantes. Reis et al. (2009) e Paulino (2011) afirmam que as composições físicas, químicas e biológicas de um corpo de água podem influenciar na hiper e hipoplasia das células de muco e que a hiperplasia em conjunto com a hipersecreção contribui para o sistema de defesa dos peixes contra o contaminante. Além disso, outros estudos como o de Leonardo et al. (2001), Domingos (2006), e Santos (2009) apontam que um dos principais mecanismos de organismos aquáticos em resposta a contaminantes é a hipersecreção de muco oriunda da hiperatividade das células mucosas do epitélio em contato com o agente tóxico.

No entanto, aos 30 dias de experimento observamos uma diminuição do número de células mucosas no grupo exposto a 3.6 mg/L, o que de acordo com Garg & Mital (1993) e Roy (1988) pode ser considerado um estado refratário devido a ciclos de fases de repouso e fases de intensa atividade de síntese durante a exposição a contaminantes. Segundo estes últimos autores, isso ocorre porque no início do experimento ocorre um aumento substancial no número destas células seguido de hipersecreção de muco, ocasionando uma diminuição das células logo em seguida, pois não retomam atividade com a mesma velocidade de síntese.

Com a técnica de Alcian Blue, encontramos resultados similares aos obtidos com a técnica de PAS. Em pH 1,0, os rastros não foram marcados, indicando que pode não haver células dessa natureza ou serem não-identificadas por esta técnica. Em pH 2,5, foi possível perceber um leve aumento destas células logo aos 14 dias de experimento, que progrediu com a exposição prolongada. Como já dito anteriormente, o muco ácido desempenha um importante papel como barreira de proteção contra partículas, agentes patogênicos e compostos tóxicos em peixes (DUNCAN et al., 2010), caracterizando uma resposta patológica ao surfactante com implicações fisiológicas. Além disso, grande parte dos proteoglicanos presentes no muco (ácido ou neutro) possui cargas elétricas na molécula, as quais podem atrair íons e assim contribuir indiretamente com a osmorregulação por meio das células ricas em mitocôndrias (POWELL et al., 1994; VARSAMOS et al., 2005). Segundo Shepard

(1989), a natureza poliônica do muco contribui para a retenção de cátions próximos ao epitélio.

As células ricas em mitocôndrias seriam observadas com a técnica de Von Kossa, de acordo com Pereira & Caetano (2009), porém nosso estudo não permitiu observar tais células, assim como também não foi observado nos estudos de Marcato (2011) e Lopes (2013). Entretanto pôde-se notar um aumento de intensidade na marcação de células de muco para esta técnica diretamente proporcional com a concentração e com o tempo de exposição, o que nos permite inferir que ocorreu uma alteração na composição química destas células, bem como em seu equilíbrio osmótico, corroborando os dados de Lopes (2013). Este teste de Von Kossa fortemente positivo para as células de muco também parece indicar tais células como excretoras de cálcio. Além disso, o excesso de produção de muco, assim como o grande sequestro de cálcio pelas células do epitélio dos rastros devem comprometer o desenvolvimento do animal devido ao redirecionamento do gasto energético. Além disso, já é sabida a importância do cálcio como segundo mensageiro citoplasmático relacionado com diversos processos cálcio-dependentes como a ativação de proteínas quinases, ativação de proteínas carreadoras de Ca^{++} como a calmodulina, a própria ação direta do cálcio nas superfícies de alguns canais de íons, alterando a permeabilidade seletiva (ALBERTS et al. 2009).

A microscopia eletrônica revelou detalhes mais finos dos eventos observados na histologia e na histoquímica. Assim como observado em H.E., com esta técnica pudemos observar a perda de integridade do tecido nos grupos tratados, mostrando que esta perda é caracterizada pelo desprendimento das células mais superficiais. Também ficou evidente a elevada quantidade de células de muco nos grupos expostos ao LAS, a qual foi aumentando progressivamente com o tempo e com as doses do surfactante, demonstrando mais uma vez a grande sensibilidade desta estrutura ao contaminante.

Ainda pela mesma técnica, uma situação inusitada que encontramos foi o encobrimento de alguns corpúsculos gustativos por muco devido à hipersecreção das células mucosas, a qual merece uma atenção especial, pois pode vir a alterar a sensibilidade gustativa dos peixes. Uma situação parecida foi encontrada no trabalho de Lopes (2013), no qual rastros branquiais expostos a esse mesmo contaminante apresentaram alterações notáveis na estrutura dos receptores químicos dos corpúsculos gustativos de *Astyanax altiparanae* (lambari). Essa situação foi

encontrada em ambos os grupos tratados, porém com mais frequência no grupo exposto a 3.6 mg/L de detergente, indicando efeitos mais severos em doses maiores de surfactante.

Em se tratando dos resultados com estudo do fígado, devemos primeiramente lembrar que alterações citológicas e histológicas neste órgão são consideradas como indícios iniciais de efeitos tóxicos, sendo, portanto, amplamente utilizados como indicadores de danos de xenobiontes em concentrações subletais (AU et al., 2004). Tais contaminantes podem ocasionar produção de radicais livres, principalmente espécies reativas de oxigênio, os quais atacam lipídeos poli-insaturados, levando à peroxidação lipídica e consequente produção de lipopigmentos (AU et al., 2004).

Nossos resultados revelaram elevação na concentração de grânulos de lipofuscina logo com 14 dias após exposição. Isso nos mostra que o tecido já enfrenta alterações em seu estado fisiológico logo nos estágios iniciais de contato com o contaminante, visto que a lipofuscina é produto da peroxidação lipídica e evidência de lesão oxidativa (BANNI et al., 2009; SILVA & SILVA 2005; SCBUTT et al., 2003; KISHI et al., 2008). Diversos trabalhos (AU et al., 2004); BORUCINSKA et al., 2009; COUILARD & HODSON, 1996; RADWAN et al., 2010; VASCHENCO et al., 2011) vêm sendo realizados com estes grânulos, os quais também apresentaram resultados similares, corroborando os nossos. Segundo Banni et al (2009), o estresse oxidativo ocorre quando as defesas antioxidantes são sobrepuidas por forças pró-oxidativas e espécies reativas de oxigênio não são corretamente liberadas. Por isso de certa forma, os grânulos de lipofuscina contribuem na desintoxicação, pois podem formar corpos residuais com elementos nocivos às células, isolando-os do citoplasma (BANNI et al., 2009; MOORE, 1991). Podemos notar ainda a crescente quantidade de lipofuscina no grupo controle, o que é esperado que aconteça com o passar do tempo. Todavia, nos grupos tratados com LAS tal acúmulo foi significativamente maior. De acordo com Banni et al. (2009), em moluscos a lipofuscina acumula-se com a idade, mas este processo pode ser acelerado, quando em contato com poluentes. Em estudo realizado por Zhao et al. (2011), além de conter membranas não digeridas e proteínas mal formadas, a lipofuscina pode acumular substâncias que, se solúveis no citoplasma, seriam altamente tóxicas. Lembrando ainda o fato de o surfactante (LAS) ser solúvel em água, característica esta que deve acarretar na alta solubilidade citoplasmática deste composto, forçando a célula a isolá-lo.

O presente estudo revelou outra situação inusitada: acúmulo de lipofuscina ao redor dos vasos sanguíneos. Por um lado, seria natural tal acúmulo nestes locais, visto que a primeira forma de contato do órgão com o contaminante é através dos vasos sanguíneos. Entretanto, essa situação pode ainda induzir o enrijecimento da parede de vasos sanguíneos não somente no fígado, mas em todo o organismo, ocasionando problemas circulatórios e patologias generalizadas nos peixes. Embora ainda há poucos trabalhos que dizem respeito de acúmulo desses pigmentos com enrijecimento de vasos, citamos aqui o trabalho de Zakliczynski et al. (2009), que demonstraram pela primeira vez a correlação de acúmulo de lipofuscina com o processo de vasculopatia de aloenxerto cardíaco (CAV) em pacientes que sofreram transplantes de coração. Esta doença tem como algumas de suas características a hiperplasia, o acúmulo de miofibroblastos, a fibrose e consequente perda de lúmen de artérias coronárias. Além de descreverem um novo fator que leva ao aumento de lipofuscina – por meio de mecanismo imunológico - eles também comprovaram o aumento desses grânulos correlacionado a anormalidades vasculares como valor preditivo para desenvolvimento de CAV.

Por fim, as análises de expressão gênica apresentam resultados interessantes, visto que observamos aumento na expressão do gene 555506. Segundo Yaroslav et al. (2010), em pacientes com doença de Stargardt ocorre acúmulo de lipofuscina no epitélio da retina, ou seja, ocorre uma falha na remoção de substâncias tóxicas para as células e, consequentemente levando a morte de células fotorreceptoras. Eles ainda relatam a relação entre a proteína transportadora de borda de membrana ABCA4 e o acúmulo de grânulos quando ela está ausente ou disfuncional, ou seja, esta proteína está ligada ao transporte de pigmentos de lipofuscina para fora da célula. Em estudos de Pereira et al. (dados não publicados pelo nosso grupo de pesquisa), ocorreu a redução na expressão do gene em *P. lineatus* acompanhado da diminuição da atividade do transportador ABC4 após 5 meses de tratamento com LAS. Em contrapartida, em nosso trabalho observamos o aumento na expressão gênica, possivelmente devido ao menor tempo de exposição (1 mês), mostrando uma possível tentativa de potencializar a produção deste transportador para eliminação da toxina ainda nos primeiros estágios de contaminação. Com o aumento de lipofuscina no tecido por meio da microscopia de fluorescência, inferimos que está havendo disfunção do transportador ABC4 ocasionada pelo LAS.

Vincenzini et al. (1982) relataram inibição competitivamente de algumas enzimas, como a lactato desidrogenase de mamíferos e a glicose-6-fosfato desidrogenase de leveduras, devido a propriedades de detergentes aniônicos de cadeia longa, como o SDS. De acordo com estes autores, ambos os substratos para estas enzimas, piruvato e glicose- 6-fosfato, possuem uma ou duas cargas negativas concentradas em pontos específicos da molécula, logo, pelo fato do detergente possuir uma cabeça hidrofílica carregada negativamente pudesse comportar-se como um inibidor e este mecanismo poderia explicar a inibição in vitro de outras enzimas pelo detergente aniônico alquilbenzeno linear sulfonado. Segundo Yaroslav et al. (2010), pouco se sabe ainda sobre as características do domínio exocitoplasmático do transportador ABC4, porém foi demonstrado que em ABCA1, outro transportador estreitamente relacionado, os domínios correspondentes parecem ser responsáveis pela interação com apolipoproteína A-I (FITZGERALD et al., 2002). É possível, portanto, que os domínios exocitoplasmáticos de ABCA4 possam estar envolvidos em interações com outras proteínas podendo haver também possível interação com o LAS, levando à inibição da enzima por competição e gerando o acúmulo destes pigmentos no fígado.

9. Conclusões

Em curimatás, a exposição ao LAS resultou em alterações morfológicas que afetam parâmetros fisiológicos básicos, sendo ainda progressivas e diretamente proporcionais à concentração do surfactante e tempo de exposição. Assim, os rastros branquiais mostraram-se sensíveis a esse tipo de estresse ambiental e com potencial para uso como biomarcador.

10. Referências

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 1396p.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. (1978). **Química orgânica**. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978. 961p.

ALVES, M. F. **Biologia reprodutiva e alimentar da pequirá *Brycomanericus stramineus* Eigenmann, 1908 no elevador da represa do Funil – MG**. 2009. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

ALVES, R. M. S. **Efeito do ambiente alterado no epitélio da escama e na alimentação de *Prochilodus lineatus* (Prochilodontidae)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2015.

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

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

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTONE, R. E.; MOORE, D. D. et al. (eds). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc. 1995

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

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 2v.

- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WHALI, T.. Histopathology in fish: Proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, vol. 22, p. 25-34, 1999.
- BRITSKI, H. S. Peixes de água doce do Estado de São Paulo - Sistemática. In: **Poluição e piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca, CPRN - Secretaria de Agricultura, p. 79-108, 1972.
- CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, vol. 3, nº 5, p. 327-336, 2007.
- CBH – MOGI. **Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Mogi Guaçu. Diagnóstico da bacia hidrográfica do rio Mogi Guaçu**. Pirassununga: CBH-MOGI, 1999, 252 p.
- COUILLARD, C. M., HODSON, P. V.. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n. 10, p. 1844–1854, 1996.
- DOMINGOS, F. X. V. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. 2006. 118f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.
- DUNCAN, F. X. V.; COSTA, O.T. F.; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M. N. Functional morphology of the gill in amazonian freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae): Implications for adaptation to freshwater. **Physiological and biochemical zoology**, Chicago, v. 83, n.1, p. 19-32, 2010.
- FITZGERALD, M. L.; MORRIS, A.L.; RHEE, J. S.; ANDERSSON, L. P.; MENDEZ, A. J.; FREEMAN, M. W. Naturally occurring mutations in the largest extracellular loops of ABCA1 can disrupt its direct interaction with apolipoprotein A-I. **J Biol Chem**. 277:33178–33187, 2002.

FERRETTI, C. M. L.; ANDRIAN, I. de F.; TORRENTE, G. Dieta de duas espécies de *Schizodon* (characiformes, Anostomidae), na planície de inundação do alto do rio Paraná e sua relação com aspectos morfológicos. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 23, n. único, p. 171-186, 1996.

FONSECA NETO, J. C.; SPACH, H. L. Morfologia e ultraestrutura de arcos branquiais de juvenis de *Mugil platanus* Günther (Pisces, Mugilidae). **Revista brasileira de zoologia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 489-500, 1999.

FUGI, R.; HAHN, N. S. Espectro alimentar e relações morfológicas com o aparelho digestivo de três espécies de peixes comedores de fundo do rio Paraná, Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, Rio de Janeiro, vol. 51, n. 4: 873-879, 1991.

FUGI, R.; HAN, N. S.; AGOSTINHO, A. A. Feeding styles of five species of bottom-feeding fishes of the high Paraná river. **Environmental Biology of Fishes**, vol. 46, p. 297-307, 1996.

GARG, T. K.; MITTAL, A. K. Observations on the function of mucous cells in the epidermis of the cat-fish *Clarias batrachus* exposed to sodium dodecyl sulfate. **Biomedical and Environmental Sciences**, vol. 6, p. 119-133, 1993.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil – subordem Characoidei: bacia do rio Mogi Guaçu**. Piracicaba: Editora Franciscana. V. 4, p. 624 -847, 1975.

GOULART, M.; CALISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, nº 1, 2003.

HERA. (2009). LAS human and environmental risk assessment on ingredients of European household cleaning products: linear alkylbenzene sulphonates, LAS. CAS n. 68411-30-3, version 4.0. <<http://www.heraproject.com/riskassessment.cfm>>.

JAGOE, H. C.; HAINES, T. A. Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, v.97, n.1-2, p.137-146, 1997.

JONSSON, C. M.; AOYAMA, H. Alteração da atividade enzimática em organismos aquáticos por poluentes de origem agrícola: uma abordagem geral e sobre a suscetibilidade da fosfatase ácida. **Quim. Nova**. vol. 33, n. 4, 920-928, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2013. 538 p.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. (1983). **Técnicas básicas de citologia e histologia**. 1^a Ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983. 123p.

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

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

LANGIANO, VOL. C; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glycoposphate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part C 147, p. 222-231, 2008.

LEONARDO, J. M. L. O.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; MOREIRA, H. L. M.; NATALI, M. R. M.; VOLSKI, T.; CAVICHIOLO, F. Histologia das brânquias de larvas de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta scientiarum. Biological sciences**, Maringá, v. 23, n. 4, p. 863-870, 2001.

LIMA, F. B.; BRACCINI, M. C.; DÍAZ, A. O.; PINHEIRO Jr., C.; GUIMARÃES, A. C. G. Morfologia das brânquias de *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann &

Eigenmann, 1889) (Characiformes, Curimatidae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 1, p. 87-92, 2009.

LOLIS, A. A.; ANDRIAN, I. de F. Alimentação de *Pimelodus maculatus* Lacépède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae), na planície de inundação do Alto do Rio Paraná, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 23, n. único, p. 187-202, 1996.

LOPES, F. P. **Caracterização dos rastros branquiais de *Astyanax altiparanae* (CHARACIDE) por técnicas histoquímicas e ultramorfológica**. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2013.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicador de qualidade águas. **UNOPAR Científica. Ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.

MACIEL, C. M. R. R. **Ontogenia de larvas de piracanjuba, *Brycon orbignyanus* Valenciennes (1849) (Characiformes, Characidae, Bryconinae)**. 2006. 229 f. Tese (Título de Doctor Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2006.

MADUENHO, L. P.; MENDES, J. P.; MARTINEZ, C. B. R. Efeitos agudos do inseticida dimilin em parâmetros histológicos do peixe *Prochilodus lineatus*. In CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8, 2007. Caxambu. *Anais...* Caxambu, 2007, p. 1-2.

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

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and others irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fish and Aquatic Sciences**, vol. 42, p. 630-648, 1985.

MARCATO, A. C. C. **Análise morfológica de brânquias de peixes *Oreochromis niloticus* (tilápia) expostos ao níquel.** Trabalho de conclusão de curso.

Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2011.

MARTINEZ, C. B. R.; SOUZA, M. M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 113A, nº 1, p. 151- 160, 2002.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 64, p. 797-807, 2004.

MAZON, A. F.; MONTEIRO, E. A. S.; PINHEIRO, G. H. D.; FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to cooper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, vol. 63, p. 621-631, 2002.

MELENDI, L. I. H.; VALDEZ, T. E. B.; CHAVEZ, T. A. G.; ARGÜELLES, T. S. S. Pigmentos de lipofuscina en el niño. Tecnicas especiales para su demostracion. 7º Congreso Virtual Hispanoamericano de Anatomía Patológica .1 a 31 de outubro de 2005.

MENIN, E. **Anátomo-histologia funcional comparativa do aparelho digestivo de seis Teleostei (pisces) de água doce.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 427,1988.

MESCHIATTI, A. J.; ARCIFA, M. S. A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin: a century of studies. **Acta Limnologica Brasileira**, vol. 21, n 1, p. 135-159, 2009.

MONTENEGRO, L. A. **Biologia alimentar de morfohistologia do tubo digestório do mussum, *Synbranchus marmoratus*, Bloch (Osteichthyes: Synbranchidae) no Açude Marechal Dutra “Gargalheiras”, localizado no semi-árido brasileiro.**

2009. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2009.

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

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F. Hábito alimentar e morfologia do tubo digestivo de *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes, Erythrinidae) da Lagoa Dourada, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. **Acta biológica paranaense**, Curitiba, v. 24, n. 1-4, p. 1-23, 1995.

MORAES, M. F. P. G.; BARBOLA, I. F.; GUEDES, E. A. C. Alimentação e Relações Morfológicas com o Aparelho Digestivo do "Curimbatá", *Prochilodus Lineatus* (Valenciennes) (Osteichthyes, Prochilodontidae), de uma Lagoa do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. 14 (1): 169 -180,1997

MUNGRAY, A. K.; KUMAR, P. Fate of linear alkylbenzene sulfonates in the environment: A review. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 63, p. 981-987, 2009.

NEUMANN, E. **Desenvolvimento inicial de jatuarana, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae)**. 2008. 108f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, São Paulo, 2008.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaríngea de *Trichomycterus brasiliensis* (Reinhardt) e suas relações com os hábitos alimentares (Silurioidei, Trichomycteridae). **Acta biológica paranaense**, Curitiba, v. 25, n. 1-4, p. 159-171, 1996.

PAES, M. C. F. **Indução à reprodução e desenvolvimento embrionário e larval do ciclídeo acará-açu *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)**. 2008. 64f. Dissertação

(Mestrado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, São Paulo, 2008.

PAULINO, M. G. **Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae)**. 2011. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2011.

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

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

PEREIRA, B. F.; ALVES, R. M. S.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CAETANO, F. H. Morphological Gill analysis of fish species *Prochilodus lineatus* after exposure to pollutants. **Environmental & Analytical Toxicology**, vol. 2, nº 3, p. 130, 2012a.

PEREIRA, B. F.; ALVES, R. M. S.; PITOL, D. L.; SENHORINI, J. A.; ALCÂNTARA-ROCHA, R. C. G.; CAETANO, F. H. Effects of exposition to polluted environments on blood cells of the fish *Prochilodus lineatus*. **Microscopy Research and Technique**, vol. 75, p. 571- 575, 2012b.

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

POWELL, M. D. SPEARE, D. J.; WRIGHT, G. M. Comparative ultraestructural morphology of lamellar epithelium, chloride and mucus cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gill. **J. Fish Biol.**, vol. 44, p. 725 – 730, 1994.

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

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

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

RODRIGUES, F. L.; BEMVENUTI, M. A. Hábito alimentar e osteologia da boca do peixe-rei, *Odontesthes humensis* de Buen (Atheriniformes, Atherinopsidae) na Lagoa Mirim, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista brasileira de zoologia**, São Paulo, v. 18, n3, p. 793-802, 2001.

RODRIGUES, S. S.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, Florianópolis, v. 19, n. 1, p. 41-50, 2006.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 49 nº 3, 2006.

ROY, D. Statistical analysis of anionic detergent-induced changes in the goblet mucous cells of opercular epidermis and gill epithelium of *Rita rita* (Ham.) (Bagridae: Pisces). **Ecotoxicology and environmental safety**, New York, v. 15, p. 260-271, 1988.

SANTOS, D. C. M. dos. **Toxidez aguda do zinco em lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. 2009, 111f. Dissertação (Título de Magister Scientiae) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SAMPAIO, A. L. A.; GOULART, E. Ciclídeos neotropicais: ecomorfologia trófica. **Oecologia Australis**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 4, p. 775-798, 2011.

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

SCHWAIGER, J. et al. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**. Vol. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.

SHEPARD, K. L. The effect of mucus and mucilaginous materials on ion distributions at epithelial surfaces. P. 123-130. In: Chantler, E. & N. A. Ratcliffe (Eds.) *Mucus and Related Topics*. Cambridge, Company of Biologist Limited, 471p, 1989.

SIGMA-ALDRICH. Sodium dodecylbenzenesulfonate 289957 ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/289957?lang=pt®ion=BR>>. Acesso em: 16 de janeiro de 2015.

SIGRH - **Sistema Integrado de Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado de São Paulo**. Comitê de Bacia Hidrográfica do Mogi-Guaçu. Secretaria de Saneamento e Recursos Hídricos. Governo do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.sigrh.sp.gov.br/cbhmogi/apresentacao>>. Acesso em: 11 fevereiro 2016.

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

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

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

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

TOLEDO-FILHO, S. A.; GODOY, M. P.; SANTOS, E. P. Curva de migração do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Pisces, Prochilodontidae) na bacia superior do Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, vol. 46, nº 2, p. 447-452, 1986.

TSYBOVSKY, Y.; MOLDAY, R. S.; PALCZEWSKI, K. The ATP-Binding Cassette Transporter ABCA4: Structural and Functional Properties and Role in Retinal Disease. **Advances in experimental medicine and biology**. 703:105-125. 2010.

VARSAMOS, S.; NEBEL, C.; CHARMANTIER, G. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: a review. **Comp. Biochem. Physiol.**, vol. 141, 401-429, 2005.

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

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

VINCENZINI M. T.; TREVES, C.; VANNI, P. Le dodécyl-sulfate de sodium, inhibiteur compétitive de quelques déhydrogénases. **C. R. Soc. Biol.** 176, 474-478. 1982.

ZACCONE, G.; KAPOOR, B. G.; FASULO, S.; AINIS, L. Structural, histochemical and functional aspects of the epidermis of fishes. **Advances in marine biology**, vol. 40, p. 255-348, 2001.

ZAKLICZYNSKI, M. et al. Vascular abnormalities and cardiomyocyte lipofuscin deposits in endomyocardial biopsy specimens of heart transplant recipients: Are they related to the development of cardiac allograft vasculopathy?. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**. v. 138, n. 1, p. 215-221. 2009.

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

11. Anexos

11.1. Protocolo das técnicas histológicas

Hematoxilina e Eosina: segundo Paulete & Beçak (1976), a técnica é composta de dois reagentes principais; a Hematoxilina, que possui características basófilas, cora o núcleo da célula de azul, e a Eosina, com características acidófilas, cora o citoplasma da célula de rosa. Na realização da técnica, as lâminas foram deixadas em água destilada por 1 minuto, depois reagiram com Hematoxilina por 10 minutos, então reagiram com água por 4 minutos, foram lavadas em água corrente, imersas em Eosina por 5 minutos e por fim, lavadas em água corrente.

PAS (Ácido Periódico e Schiff): segundo Paulete & Beçak (1976), o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos neutros, oxida-os e dá lugar à formação de aldeídos, que podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Para a realização desta técnica, as lâminas foram imersas em Ácido Periódico 0,4% por 10 minutos, lavadas em água destilada, colocadas para reagir com o Reativo de Schiff por 1 hora no escuro, lavadas em 3 banhos de 1 minuto em água sulforosa e lavadas em água corrente por 10 minutos.

Azul de Alcian (pH 2,5): segundo Junqueira & Junqueira (1983), esta técnica baseia-se nas ligações eletrostáticas que se estabelecem entre um reagente carregado positivamente com polissacarídeos ácidos tais como glicosaminoglicanos em cartilagens e alguns tipos de mucopolissacarídeos, de maneira que estes coram-se em azul celeste. Na realização da técnica os cortes foram lavados em ácido acético

a 3% e, em seguida, transferidos para a solução de Alcian (pH 2,5) durante 30 minutos e então lavados em água corrente.

Azul de Alcian (pH 1,0): segundo Junqueira & Junqueira (1983). Na realização da técnica os cortes foram lavados em ácido acético a 3% e em seguida transferidos para a solução de Alcian (pH 1,0) durante 30 minutos e então lavados em água corrente.

Von Kossa: segundo Pereira & Caetano (2009), esta técnica pode ser utilizada para detecção de células ricas em mitocôndrias (antigamente chamadas de células de cloro), uma vez que marca o cálcio presente nessas células. A técnica realizada pelos autores foi adaptada de Junqueira & Junqueira (1983) e segundo estes últimos, o princípio desta técnica consiste em reação de precipitação, na qual íons de prata reagem com fosfato na presença de pH ácido. Para a realização desta técnica as lâminas foram imersas por 20 minutos em nitrato de prata, depois lavadas rapidamente em água, reveladas com D-72 por dois minutos, tratadas com tiosulfato 5% por 30 minutos e em seguida lavadas em água destilada.

11.2. Decisão do Comitê de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Rio Claro

COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAL
CEUA - IB - UNESP - CRC

DECISÃO CEUA Nº 031/2012 (2ª via)

Instituição: UNESP – IB – CRC	Departamento: Biologia
Protocolo nº: 3358	Data de Registro CEUA: 04.05.2012
Projeto de Pesquisa: "Efeito do ambiente alterado no epitélio da escama e na alimentação de <i>Prochilodus lineatus</i> (Prochilodontidae)"	

Pesquisador Responsável: FLÁVIO HENRIQUE CAETANO

Orientando(a): Rebeca Mamede da Silva Alves

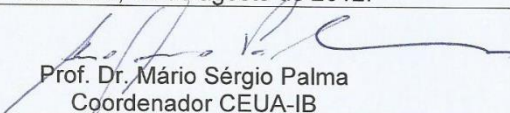
Colaborador(a): Rui Godinho Lobo Girão Ribeiro

Objetivo Acadêmico:	() TCC (X) Mestrado () Doutorado () Outros – (Especificar)
---------------------	--

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA do Instituto de Biociências da UNESP – Campus de Rio Claro, em sua 13ª reunião ordinária, realizada em 15.08.2012.

(X)	Aprovou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Desde que atendidas as pendências apontadas na reunião (vide anexo), aprova o Projeto de Pesquisa acima citado (prazo máximo de 30 dias).
()	Referendou o Projeto de Pesquisa acima citado, ratificando o parecer emitido pelo relator.
()	Aprovou retornar ao interessado para atendimento das pendências encontradas (prazo máximo de 30 dias).
()	Não Aprovou.
()	Retirou , devido à permanência das pendências.

Rio Claro, 15 de agosto de 2012.


Prof. Dr. Mário Sérgio Palma
Coordenador CEUA-IB

11.3. Análise química da água utilizada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS
Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica – H₂L

RELATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS

Interessado: Prof. Dr. Flavio Henrique Caetano

Material Entregue Declarado: Água

Natureza do Trabalho: Diversas Determinações

Referência: 03 amostras entregues por Rebeca, abaixo identificadas

RESULTADOS:

H ₂ L	Amostra	Temp.	Cond.	pH	Alcalinidade	
No.	Identif.	°C	µS/cm		HCO ₃ ⁻	CO ₃ ²⁻
					mg/L	mg/L
6594	DZ	25	339	8,15	131	ND
6595	DI	25	399	8,38	145	15,2
6596	Controle	25	412	8,05	103	ND

H ₂ L	Amostra	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	C ₂ O ₄ ²⁻	Acetato	Br ⁻
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	DZ	0,19	13,5	0,37	41,8	2,57	6,91	< 0,10	3,13	< 0,030
6595	DI	0,24	11,9	0,45	45,7	3,70	13,7	< 0,10	3,23	< 0,030
6596	Controle	0,17	44,2	0,45	49,8	3,77	6,40	< 0,10	3,81	< 0,030

H ₂ L	Amostra	Li	Na	NH ₄	K	Al	Ba	Be	Ca
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	DZ	< 0,010	42,8	< 0,050	3,06	0,052	0,051	< 0,005	24,8
6595	DI	< 0,010	52,2	< 0,050	2,91	0,080	0,063	< 0,005	29,1
6596	Controle	< 0,010	58,4	< 0,050	3,28	0,017	0,057	< 0,005	22,2

H2L	Amostra	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	DZ	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	4,05	< 0,001
6595	DI	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	4,68	< 0,001
6596	Controle	< 0,005	< 0,003	< 0,003	< 0,004	< 0,005	3,78	< 0,001

H2L	Amostra	Mo	Ni	P	Pb	Si	Sn	Sr	V	Zn
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
6594	DZ	< 0,005	< 0,003	1,64	< 0,005	0,43	< 0,005	0,11	0,014	0,009
6595	DI	< 0,005	< 0,003	2,07	< 0,005	0,82	< 0,005	0,13	0,016	0,007
6596	Controle	< 0,005	< 0,003	2,24	< 0,005	0,63	< 0,005	0,098	0,016	0,010

ND: valor não detectado

- O Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica foi proficiente nos Programas de Ensaio de Proficiência PEP 005/2011 e PEP 006/2011 para os analitos Ca, Pb, Cu, Fe, Mg, Mn, Zn, Ni, Sb, Al, Ba, Mo, Sn, Li, Sr, Cl, F, SO₄, NO₃, P_{total}, NO₂+NO₃, Dureza Total. Os Programas de Ensaio de Proficiência foram organizados pelo CETIND – Centro de Tecnologia Pedro Ribeiro (FIEB-SENAI) Provedor de Ensaio de Proficiência Habilitado pela ANVISA.

- Os cátions Na, K, Li, NH₄ e os ânions acetato e oxalato foram analisados por Cromatografia Iônica (IC).

Parâmetro Analítico	Método Analítico
Alumínio, Bário, Berílio, Cálcio, Cádmio, Cobalto, Crômio, Cobre, Ferro, Magnésio, Manganês, Molibdênio, Níquel, Fósforo, Chumbo, Silício, Estanho, Estrôncio, Vanádio, Zinco.	SMEWW 3120B
Fluoreto, Cloreto, Nitrito, Nitrato, Fosfato, Sulfato, Brometo	EPA 300.0 – 300.1
pH (a 25°C)	SMEWW 4500 H B
Alcalinidade	SMEWW 2320B
Dureza	SMEWW 2340B
Cor	SMEWW 2120C
Turbidez	SMEWW 2130B
Condutividade	SMEWW 2510B

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

Rio Claro, 11 de maio de 2014.

MSc. Mirtis Irene Ariza Malagutti

		VMP				VMP	
Parâmetro	LQ H ₂ L (mg L ⁻¹)	RDC 274 (mg L ⁻¹)	Portaria 2914 (mg L ⁻¹)	Parâmetro	LQ H ₂ L (mg L ⁻¹)	RDC 274 (mg L ⁻¹)	Portaria 2914 (mg L ⁻¹)
Cátions				Ânions			
Alumínio	0,005	---	0,2	Acetato	0,10		---
Bário	0,001	0,7	0,7	Bicarbonato	2,00		---
Cádmio	0,005	0,003	0,005	Bromato	0,015		0,025
Cálcio	0,003	---	---	Brometo	0,030	---	---
Chumbo	0,005	0,010	0,01	Carbonato	2,00		---
Cobalto	0,003	---	---	Cloreto	0,010	---	250
Cobre	0,004	1	2	Clorito	0,015		0,2
Cromo	0,003	0,05	0,05	Fluoreto	0,010	---	1,5
Estrôncio	0,005	---	---	Fosfato	0,040	---	---
Ferro	0,005	---	0,3	Nitrato	0,040	50	10*
Lítio	0,010	---	---	Nitrito	0,020	0,02	1*
Magnésio	0,002	---	---	Oxalato	0,10		---
Manganês	0,001	0,5	0,1	Sulfato	0,020	---	250
Níquel	0,003	0,02	---				
Potássio	0,030	---	---				
Silício	0,06	---	---				
Sódio	0,015	---	200				
Vanádio	0,003	---	---				
Zinco	0,005	---	5				

Observações: * Calculado como N; VMP – valor máximo permitido; LQ – limite de quantificação

11.4. Análise química da concentração real de surfactante



Global Análise e Consultoria

Rua: Santos Dumont, 800

CEP: 13566-445, Vila Celina

São Carlos-SP

Telefone: (16) 3361-3213, ramal 220

Estudo do Ácido Dodecylbenzene Sulfônico - LAS

Estudo/Ativo: LAS

Solicitante: Rebeca Alves

Endereço: UNESP- Rio Claro

Código do Estudo: Amostra de água

Realização/Unidade Operacional: Global Análise & Consultoria

Responsável pelo estudo: Dra Dalva Aparecida de Souza

ESTUDO: 11/07/2017

-Determinação da concentração LAS

-Análises Cromatográficas

O equipamento utilizado para as análises cromatográficas foi um HPLC Agilent Technologies 1200 series, com detector de Fluorescência.

Foi detectada uma série de quatro homólogos,

Tabela1: Concentração do LAS

AMOSTRA	Concentração-mg/L
D1	0,027
D11	0,34
D12	0,38
D13	0,41
D21	3,51
D22	3,62
D23	3,72

Dra. Dalva Aparecida de Souza

CRQ04160236