

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 23/02/2019.

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

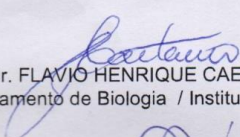
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE MORFOFISIOLÓGICA DE RASTROS BRANQUIAIS E FÍGADO DE *Prochilodus lineatus* (CURIMBATÁ) APÓS EXPOSIÇÃO A ALQUILBENZENO SULFONATO LINEAR (LAS)

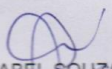
AUTOR: JOÃO RODOLFO TUCKUMANTEL VALIM

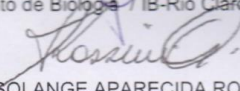
ORIENTADOR: FLAVIO HENRIQUE CAETANO

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).

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 glyphosate-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.