

Avaliação da integração de biomarcadores na barreira intestinal: uma abordagem para avaliação da qualidade ambiental.

Alexandre Rodrigo Nascimento Gonçalves

São Vicente, SP

- 2021-



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



Avaliação da integração de biomarcadores na barreira intestinal: uma abordagem para avaliação da qualidade ambiental.

Pós-graduando: Alexandre Rodrigo Nascimento Gonçalves

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Renata de Britto Mari

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Paloma Kachel Gusso-Choueri

Dissertação apresentada no Instituto de Biociências –
Campus do Litoral paulista, UNESP, para obtenção do
título de Mestre pelo Programa de Biodiversidade de
Ambientes Costeiros.

São Vicente, SP

-2021-

G635a

Gonçalves, Alexandre Rodrigo Nascimento

Avaliação da integração de biomarcadores na barreira intestinal:
uma abordagem para avaliação da qualidade ambiental. / Alexandre
Rodrigo Nascimento Gonçalves. -- São Vicente, 2021

83 p. : il., tabs., fotos, mapas

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências, São Vicente

Orientadora: Renata de Britto Mari

Coorientadora: Paloma Kachel Gusso-Choueri

1. Sistema nervoso entérico. 2. Estresse oxidativo. 3. Metabolismo
neuronal. 4. Óxido nítrico. 5. Muco intestinal. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de
Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, desejo agradecer a Deus por todas as bênçãos e portas que foram abertas ao longo de todos esses anos. Graças a esse auxílio, pude realizar essa pesquisa e conhecer todas as pessoas que ajudaram a fazer esse trabalho possível;

Dedico e agradeço a toda a minha família, com especial destaque para minha mãe Rosemeire e meu pai Salatiel, que sempre me apoiaram e auxiliaram ao longo dessa jornada, e que através de todos os conselhos, ensinamentos e lições fizeram a pessoa que sou hoje. Também, agradeço a meus irmãos André e Andressa e a meu cunhado Ivo por todo apoio. Faço um agradecimento especial a meu irmão André, que participou das atividades da coleta na Estação Ecológica Jureia-Itatins, o que foi muito importante para que essa pesquisa fosse realizada;

Agradeço minha sobrinha Nicole que mesmo fazendo muita bagunça, sempre alegra nossos dias. Gostaria de agradecer a minhas avós Rosinha e Conceição por todo o carinho e preocupação que sempre tiveram;

Agradeço a Universidade Estadual Paulista e ao IB/CLP onde realizei minha graduação e mestrado;

Agradeço ao Programa de Biodiversidade de Ambientes Costeiros;

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Capes, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento dessa pesquisa (Proc.nº88882.436019/2019-01);

Agradeço minha orientada Profa. Renata, que desde a graduação me orienta e que me apresentou esse universo fascinante do trato gastrointestinal e sistema nervoso entérico. Ao longo de toda essa jornada foram inúmeras conversas, conselhos, broncas, elogios, que me levaram a ser o profissional que sou hoje. Ao longo de todo esse tempo nossa relação evoluiu muito e tenho certeza que continuaremos desenvolvendo inúmeros projetos juntos;

Agradeço a minha co-orientadora Profa. Paloma, que junto comigo e a Profa. Renata aceitou explorar esse mundo fascinante da barreira intestinal. Sou grato pela oportunidade dada pela Profa. Paloma, pois através dessa parceria pude colaborar em diferentes projetos e adquirir inúmeros conhecimentos. Tenho certeza que essa parceria ainda tem muito para crescer e que podemos realizar inúmeros projetos conjuntamente;



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



Agradeço ao Prof. Denis por toda a parceria, abrindo as portas de seu laboratório juntamente com a Profa. Paloma e permitindo o meu contato com esse mundo das análises bioquímicas;

Agradeço ao Prof. Marcos, que auxiliou com o transporte para coleta na Estação Ecológica da Jureia-Itatins, o que foi fundamental para que essa pesquisa fosse realizada;

Agradeço as Profas. Joice e Ana Júlia, membros da minha banca de qualificação, e que contribuíram com inúmeros conselhos muito para a elaboração da dissertação;

Agradeço a Nathalia, que durante todo o mestrado foi uma grande parceira, fundamental para a organização das coletas, discussão de resultados e nos momentos de descontração. Nossos trabalhos foram feitos juntos e tenho certeza que poderemos colaborar ainda mais um com o outro em futuros trabalhos;

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Morfofisiologia Animal (LABMA), que sempre mantiveram um clima extremamente agradável e sempre sem hesitar auxiliaram e colaboram em todas as coletas. Faço um agradecimento especial a Giovanna, que se envolveu diretamente no projeto; a Gabriela que sempre esteve junto contribuindo com inúmeras ideias, e ao Ítalo e Leticia, que mesmo não estando envolvidos no projeto se prontificaram para ajudar na coleta da Estação Ecológica da Jureia-Itatins, mesmo com todas as dificuldades que aconteceram;

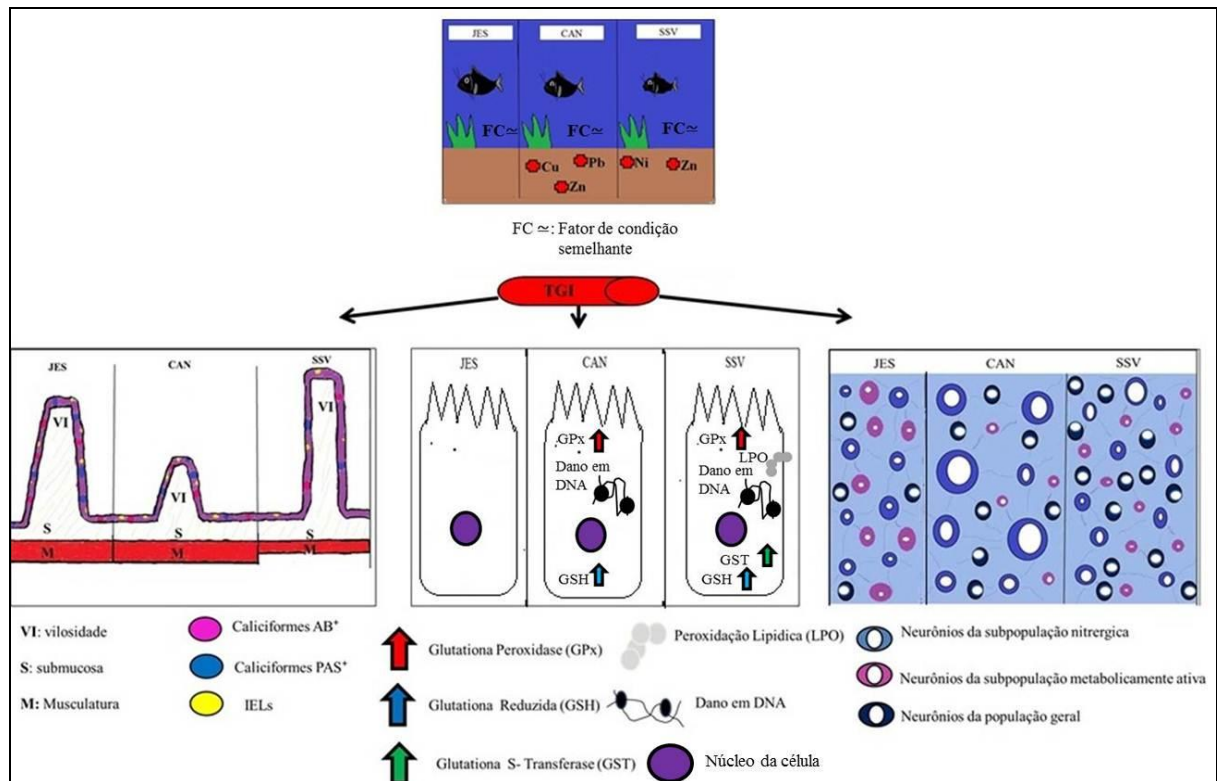
Agradeço a todos os meus amigos que sempre me incentivaram e ouviram meus desabafos em diferentes momentos ao longo do mestrado. Cada um a sua maneira contribuiu para que esse trabalho fosse realizado;

Agradeço a todos os funcionários do campus, que sempre estiveram a disposição permitindo que toda a estrutura da universidade funcione;

Agradeço a todos os meus professores do Mestrado e Graduação por todos os conhecimentos passados, que foram fundamentais para que esse projeto fosse realizado;

Por fim, agradeço a natureza e aos peixinhos utilizados nessa pesquisa. Espero que os resultados dessa pesquisa e de todas as outras contribuam para que façamos um futuro melhor e uma sociedade mais preocupada com o meio ambiente.

RESUMO GRÁFICO



RESUMO

O litoral paulista apresenta regiões estuarinas heterógenas em relação aos níveis de ação antrópica, destacando a Estação ecológica Jureia-Itatins (JES) uma área bem preservada, que se caracteriza como uma área de proteção integral; o Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) uma área de proteção afetada por rejeitos de antigas atividades mineradoras; e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) uma região altamente populosa e com atividades industriais. Trabalhos com diferentes biomarcadores se fazem necessários, pois fornecem informações sobre a integridade e funcionamento dos órgãos. O trato gastrointestinal (TGI) configura-se como uma barreira altamente seletiva, com grande potencial plástico, sendo fundamental para a manutenção da homeostase dos organismos. Baseado no fato de a via alimentar ser uma das principais rotas de exposição dos organismos aos contaminantes, e de que a barreira intestinal é altamente responsiva aos efeitos da contaminação, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade ambiental de três regiões do litoral do paulista com diferentes níveis de ação antrópica, e investigar como a barreira intestinal se comporta nessas regiões. Nas três regiões de estudo foram coletados juvenis de bagres *Genidens barbus* para as análises biológicas e sedimentos para quantificação de diferentes metais. Os bagres tiveram seus segmentos intestinais coletados para a avaliação da estratigrafia intestinal; identificação dos linfócitos intra-epiteliais (IELs) e células caliciformes AB⁺ e PAS⁺; análises morfoquantitativas das subpopulações neuronais mioentéricas geral (Giemsa), metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) e nitrérgica (NADPH-dr⁺) e avaliações bioquímicas, tais como, presença de dano em DNA e peroxidação lipídica (LPO) e atividade da Glutathione Reduzida (GSH), Glutathione Peroxidase (GPx) e Glutathione S-Transferase (GST). Os resultados foram submetidos ao teste de One way ANOVA com nível de significância de 5%. A significância das diferenças entre os tratamentos foi avaliada também por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA) multivariada, e os resultados dos biomarcadores bioquímicos também foram integrados por meio do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR). Três metais apresentaram concentrações elevadas no sedimento de CAN (Cu, Pb e Zn), enquanto em SSV os ISQGs específicos a classificaram como moderadamente contaminada por Zn e Ni. Valores elevados de dano em DNA ocorreram em CAN, juntamente com vilosidades com menores alturas ($p < 0,05$), indicando perturbações no processo de *turnover*. Esses danos causados pela exposição aos metais explica a redução dos neurônios metabolicamente ativos no plexo mioentérico ($p < 0,05$) e o aumento na expressão de NO como estratégia neuroprotetora pelos neurônios nitrérgicos. Porém, diferente de SSV, as alterações observadas no TGI dos bagres de CAN aparentemente não tiveram relação direta com o estresse oxidativo, mas sim da interação dos íons metálicos com o material genético. Em SSV as alterações na mucosa ocorreram com as menores quantidades de caliciformes ($p < 0,05$), o que está relacionado com os elevados níveis de atividade das enzimas do sistema antioxidante e de LPO. Também, nessa região foi observado uma diminuição do metabolismo geral do plexo mioentérico, mas principalmente nas subpopulações mais sensíveis a contaminação. Conclui-se, que as três regiões estuarinas apresentaram diferentes qualidades ambientais, o que se refletiu nas alterações na plasticidade da barreira intestinal. Essa barreira mostrou-se extremamente responsiva e comportou-se de maneiras diferentes nas três regiões estuarinas.

Palavras chave: sistema nervoso entérico; estresse oxidativo; metabolismo neuronal; oxido nítrico; muco intestinal; biomonitoramento; estuários; contaminação do sedimento.

ABSTRACT

The coast of São Paulo presents estuarine regions that are heterogeneous in relation to the levels of anthropic action, highlighting the Jureia-Itatins Ecological Station (JES), a well-preserved area, which is characterized as an area of integral protection; the Cananéia-Iguape-Peruíbe Estuarine Lagoon System (CAN), a protected area affected by tailings from former mining activities; and Santos-São Vicente Estuarine Complex (SSV), a highly populated region with industrial activities. Work with different biomarkers is necessary, as they provide information about the integrity and functioning of organs. The gastrointestinal tract (GIT) is a highly selective barrier, with great plastic potential, being essential for the maintenance of homeostasis of organisms. Based on the fact that the food route is one of the main routes of exposure of organisms to contaminants, and that the intestinal barrier is highly responsive to the effects of contamination, this study aims to evaluate the environmental quality of three regions of the coast of São Paulo, with different levels of anthropic action, and investigate how the intestinal barrier behaves in these regions. In the three study regions juveniles of *Genidens barbus* catfish were collected for biological and sediment analysis to quantify different metals. Catfish had their intestinal segments collected for the assessment of intestinal stratigraphy; identification of intraepithelial lymphocytes (IELs) and AB+ and PAS+ goblet cells; Morphoquantitative analysis of general myenteric (Giemsa), metabolically active (NADH-dr+) and nitrergic (NADPH-dr+) neuronal subpopulations and biochemical evaluations, such as presence of DNA damage and lipid peroxidation (LPO) and Reduced Glutathione (GSH) activity), Glutathione Peroxidase (GPx) and Glutathione S-Transferase (GST). The results were submitted to the One way ANOVA test with a significance level of 5%. The significance of differences between treatments was also assessed using the multivariate Permutation Analysis of Variance (PERMANOVA), and the results of biochemical biomarkers were also integrated using the Integrated Biomarker Response Index (IBR). Three metals showed high concentrations in the CAN sediment (Cu, Pb and Zn), while in SSV the specific ISQGs classified it as moderately contaminated by Zn and Ni. High values of DNA damage occurred in CAN, together with villi with smaller heights ($p < 0.05$), indicating disturbances in the turnover process. These damages caused by exposure to metals explain the reduction of metabolically active neurons in the myenteric plexus ($p < 0.05$) and the increase in NO expression as a neuroprotective strategy by nitrergic neurons. However, unlike SSV, changes observed in the GIT of CAN catfish apparently had no direct relationship with oxidative stress, but rather with the interaction of metallic ions with genetic material. In SSV, the mucosal alterations occurred with the smallest amounts of goblets ($p < 0.05$), which is related to the high levels of activity of the enzymes of the antioxidant system and of LPO. Also, in this region, a decrease in the general metabolism of the myenteric plexus was observed, but mainly in subpopulations more sensitive to contamination. It is concluded that the three estuarine regions had different environmental qualities, which was reflected in changes in the plasticity of the intestinal barrier. This barrier was extremely responsive and behaved differently in the three estuarine regions.

Keywords: enteric nervous system; oxidative stress; neuronal metabolism; nitric oxide; intestinal mucus; biomonitoring; estuaries; sediment contamination.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos (salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água) e caracterização do sedimento (granulometria, matéria orgânica (M.O) e carbonato) das áreas Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).....	33
Tabela 2. Concentração (mg/kg) de metais no sedimento das regiões Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)...	34
Tabela 3. Parâmetros biométricos (peso, comprimento corporal, área intestinal, fator de condição) expressões em média $\pm$ desvio padrão e Correção de Pearson entre as variáveis peso e comprimento corporal, dos bagres <i>Genidens barbatus</i> (n=10 por grupo) das áreas Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).....	36
Tabela 4. Espessura das camadas estratigráficas do intestino de bagres <i>Genidens barbatus</i> (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).....	39
Tabela 5. Relação Caliciformes AB ⁺ /Enterocitos, Caliciformes PAS ⁺ /Enterocitos e IELs/Enterocitos do intestino de bagres <i>Genidens barbatus</i> (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).....	40
Tabela 6. Densidade neuronal/mm ² e análise monométrica do perfil celular (PC) e nuclear (PN) da população neuronal geral mioentérica (Giemsa) e das subpopulações neuronais mioentéricas nitrgica (NADPH-dr ⁺) e metabolicamente ativa (NADH-dr ⁺) do intestino de bagres <i>Genidens barbatus</i> (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente	44

(SSV).....

Tabela 7. PERMANOVA calculada a partir dos dados dos biomarcadores bioquímicos e morfológicos, assim como Análise multivariada dos bagres das regiões da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... **52**

Tabela 8. Fatores extraídos nas análises dos bagres *Genidens barbus* do Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (fator 1) e Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (fator 2)..... **54**

Lista de Figuras

- Figura 1.** Mapa da região costeira do litoral do Estado de São Paulo, com destaque para as três áreas de coleta: JES (Estação Ecológica Jureia-Itatins), SSV (Complexo Estuarino de Santos-São Vicente) e CAN (Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe)..... 24
- Figura 2.** Correlação de Pearson dos valores de peso (g) e comprimento corpóreo (cm) dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (muito forte – $p = 0,92$), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (muito forte – $p=0,95$) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (forte – $p=0,71$)..... 37
- Figura 3.** Fotomicrografia do intestino de bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (B) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (C), indicando as vilosidades (Vl), submucosa (S), musculatura (M), epitélio retilíneo (cabeça de seta) e vilosidades fundidas (seta)..... 38
- Figura 4.** Representação gráfica da espessura das camadas da parede intestinal (μm^2) dos bagres *Genidens barbus* ($n=10$ por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... 39
- Figura 5.** Representação gráfica das relações Caliciformes AB^+ /Enterócitos, Caliciformes PAS^+ /Enterócitos e IELs/Enterócito do epitélio intestinal dos bagres *Genidens barbus* ($n=10$ por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... 41
- Figura 6.** Fotomicrografia do intestino dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A, B e C), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (D, E e F) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (G, H e I). (*) células caliciformes PAS^+ evidenciadas pela técnica de Reativo de Schiff, (cabeça de seta) células caliciformes AB^+ evidenciadas pela técnica de Alcian Blue, (setas) Linfócitos Intra- 42

epiteliais (IELs) evidenciados pela técnica de HE.....

Figura 7: Fotomicrografia do plexo mioentérico de bagres *Genidens barbus*, da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A, B, G e J); Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (C, D, H e K) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (E, F, I e L), evidenciando as população neuronal geral (J, K e L), subpopulação nitrérgica (A, B, C, D, E e F) e subpopulação metabolicamente ativa NADH-dr⁺ (G, H e I)..... **43**

Figura 8. Densidade neuronal (mm²) da população neuronal geral (Giemsa), subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) e subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) do plexo mioentérico do intestino de bagres *Genidens barbus* (n=10 por região), coletados nas áreas Estação Ecológica Jureia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... **45**

Figura 9. Perfil celular (PC) (A) e perfil nuclear (PN) (B) dos neurônios da população neuronal geral (Giemsa), subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) e subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) do plexo mioentérico do intestino de bagres *Genidens barbus* coletados nas regiões Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... **46**

Figura 10. Correlação de Pearson dos valores de PC e PN dos neurônios mioentérico da população geral (Giemsa) (A, D e G), subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) (B, E e H) e subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) (C, F e I) dos bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A, B e C), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (D, E e F) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (G, H e I). Correlação forte (A,D,E,F,G,H e I) e correlação modera (B e C)..... **47**

Figura 11. Histograma de frequência dos perfis celular (PC) e nuclear (PN) dos neurônios da população neuronal geral (Giemsa) (A e D), subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) (B e E) e subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) (C e F) do plexo mioentérico do intestino de bagres *Genidens barbus* coletados nas áreas de Estação Ecológica Jureia-Itatins (JES), Sistema Estuarino **48**

Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). Nas comparações entre as classes de PN letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).....

- Figura 12.** Respostas dos biomarcadores de efeito, LPO (A) e Dano em DNA (B) e de exposição GSH (C), GST (D) e GPx (E) do intestino dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$)..... 50
- Figura 13.** Respostas integradas dos biomarcadores bioquímicos no intestino dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... 51
- Figura 14.** Análise de n-MDS indicando a separação das regiões avaliadas através de análises multivariadas (PERMANOVA). Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)..... 53

Lista de Abreviações

JES - Estação Ecológica Juréia-Itaitins;
CAN - Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe;
SSV - Complexo Estuarino de Santos-São Vicente;
TGI – Trato gastrointestinal;
SNE – Sistema Nervoso Entérico;
IELs - Linfócitos intra-epiteliais;
NO – Óxido nítrico;
ROS – Espécies reativas de oxigênio;
NADPH-dr⁺ - Subpopulação NADPH-diaforase reativos;
NADH-dr⁺ - Subpopulação NADPH-diaforase reativos;
PC – Perfil celular;
PN – Perfil nuclear;
HE – Hematoxilina e Eosina
GPx-Glutationa Peroxidase
GSH-Glutationa
GST-Glutationa S-transferase
LPO-Peroxidação lipídica
IBR- Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores
PCA- Análise fatorial com análise de componentes principais
PERMANOVA- Análise Permutacional de Variância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAIS e MÉTODOS	23
2.1 Animal Modelo	23
2.2 Áreas de estudo	23
2.3 Análises sedimentologias e dos parâmetros físico-químicos	24
2.3.1 <u>Análise granulométrica</u>	24
2.3.2 <u>Análise de Matéria Orgânica</u>	24
2.3.3 <u>Análise do teor de carbonato</u>	25
2.3.4 <u>Quantificação de metais no sedimento</u>	25
2.3.5 <u>Análise dos parâmetros físico-químicos da água</u>	26
2.4 Coleta dos animais e Determinação do Fator de Condição (FC)	26
2.4.1 <u>Coleta dos animais</u>	26
2.4.2 <u>Determinação do Fator de Condição (FC)</u>	27
2.5 Análise histológica da parede intestinal	27
2.6 Avaliação morfoquantitativa dos neurônios mioentérico	28
2.6.1 <u>Deteção da população neuronal geral (GIEMSA) (BARBOSA, 1979)</u>	28
2.6.2 <u>Deteção da população neuronal nitrérgica (NADPH-dr+) (SCHERER-SINGLER et al., 1983)</u>	28
2.6.3 <u>Deteção da população neuronal metabolicamente ativa (NADH-dr+) (GABELLA, 1969)</u>	28
2.6.4 <u>Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos</u>	29
2.7. Análises Bioquímicas	30
2.8. Análise estatística	31
2.8.1 <u>Correlação de Pearson</u>	31
2.8.2 <u>Tratamento dos dados</u>	31
3. RESULTADOS	33
3.1 Parâmetros físico-químicos e caracterização do sedimento	33
3.2 Quantificação de metais no sedimento	34
3.3 Parâmetros biométricos	35
3.4 Análise histológica do intestino	38
3.5 Análise morfoquantitativa do Plexo Mioentérico	42
3.6 Biomarcadores bioquímicos	49
3.7 Permanova e n-MDS	52
3.8 Análise de Componentes Principais	53
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÃO	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. INTRODUÇÃO

As regiões estuarinas são ambientes de transição, onde ocorre o encontro de um corpo de água doce com o ambiente marinho (MIRANDA, 2002). Como são áreas extremamente ricas em nutrientes, funcionam como berçários naturais, pois são utilizadas por diferentes espécies de vertebrados e invertebrados como áreas de alimentação, abrigo e reprodução (BIANCHI, 2006; ELLIOTT; WHITFIELD, 2011). Além da importância para a biodiversidade, apresentam relevância econômica, pois muitas abrigam portos e fornecem uma série de serviços ecossistêmicos como, por exemplo, obtenção de alimento (pesca), ciclagem de nutrientes, turismo, recreação, extração de recursos naturais, etc (UNEP, 2006; BARBIER et al., 2011).

As regiões estuarinas no litoral paulista no Brasil são heterogêneas apresentando diferentes níveis de interferência antrópica. Nesse sentido, a Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) uma região bem preservada, que se caracteriza como uma área de proteção integral, que compõe o Mosaico de Unidades de Conservação da Juréia-Itatins, região essa que faz parte da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (UNESCO, 1992) e que engloba os municípios de Peruíbe, Itatiti, Miracatu e Iguape. Com base nesse grau de preservação, essa região é utilizada como área referência em estudos sobre a influência antrópica (PINHEIRO et al., 2013; DIAS, 2015; da SILVA BIANCI et al., 2017; de ALMEIDA DUARTE et al., 2017; MARINSEK et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020).

O Mosaico de Unidades de Conservação da Juréia-Itatins junto com a Área de Proteção Ambiental de Cananeia-Iguape-Peruíbe, que está sob proteção federal, forma um dos locais mais bem preservados da Mata Atlântica, contribuindo para a manutenção e preservação de diversos ecossistemas e espécies. Nessa região localiza-se o Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruibe, que faz parte de uma rede de canais estuarinos e lagunares conectados ao Rio Ribeira de Iguape e por um conjunto de ecossistemas frágeis, como manguezais. Tal região integra o Vale do Ribeira, que tem o menor índice de desenvolvimento econômico do estado de São Paulo (PERINA & ABESSA, 2020). Contudo, desde 1852 com a finalização da obra do Canal do Valo Grande, essa região vem sofrendo mudanças significativas em sua salinidade, no regime de sedimentação, densidade de foraminíferos e na entrada de metais pesados no ambiente, originários da mineração de prata

(Ag), zinco (Zn) e chumbo (Pb), que ocorria em regiões a montante (MAHIQUES et al., 2009; PERINA & ABESSA, 2020).

Apesar da extração de chumbo ter sido interrompida em 1995 pelo esgotamento das reservas, os resíduos das duas principais minas, ainda estão nas margens do Rio Ribeira de Iguape, podendo ser lixiviados para dentro do mesmo (MAHIQUES et al., 2009; PERINA & ABESSA, 2020). Em diferentes pontos desse sistema estuarino foi descrito a presença de metais no sedimento, tais como, cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), chumbo (Pb), manganês (Mn), zinco (Zn) e níquel (Ni) (CRUZ et al 2014; 2019; SALGADO et al., 2019). A Cetesb utilizando critérios do Conselho Canadense de Ministros do Meio Ambiente encontrou níveis de metais acima do nível TEL ao longo do tempo (PERINA & ABESSA, 2020), tal legislação estipula esse nível como de efeito limiar e o PEL como de efeito provável e severos.

Nos últimos anos, diferentes trabalhos têm descrito organoclorados provenientes de atividades agrícolas, além de fármacos, bisfenilos policlorados, cafeína, fenoprofeno, etc, que adentram o ambiente, próximo da cidade de Cananéia por meio do esgoto não tratado (MATOS, 2002; SALGADO et al., 2019). Cabe ressaltar, que o despejo de esgoto é intensificado nas épocas de veraneio com o aumento significativo da atividade turística na região (PERINA & ABESSA, 2020). No Índice de Qualidade de Águas Costeiras (IQCA), a região do Mar de Cananéia apresentou com qualidade da água classificada como boa, apesar de apresentar no ano de 2020 valores inferiores à média histórica e a região estar demonstrando desde o ano de 2019, processo de eutrofização (CETESB, 2020).

Ainda no litoral do estado de São Paulo, localiza-se o Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) situado na Baixada Santista, uma região altamente populosa, com grande déficit habitacional e de saneamento básico, turística (famosa pelo turismo de segunda residência) e por apresentar grande atividade industrial, destacando o Porto de Santos, o maior da América Latina, e o Polo Industrial de Cubatão.

Essa região apresenta os canais de Santos e São Vicente, onde é descrito alta contaminação por cobre (Cu), cádmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni) vanádio (V), chumbo (Pb), zinco (Zn) e mercúrio (Hg) no sedimento (LAMPARELLI et al., 2001; ABESSA et al., 2008; HORTELLANI et al., 2008; CHOUERI et al., 2009; PINTO et al., 2015), além de hidrocarbonetos aromáticos originários de esgoto doméstico não tratado e da drenagem de antigos aterros sanitários (CHOUERI et al., 2009). No caso do Canal de São Vicente, os

valores do IQAC classificam a qualidade da água como ruim ou péssimo em todos os anos no período de 2012 a 2020, destacando um piora no período de 2019 a 2020 em relação a eutrofização (CETESB, 2020).

Ainda, em diferentes pontos de SSV é relatada presença de solventes aromáticos, organoclorados (ABESSA et al., 2008; CHOUERI et al., 2009; PINTO et al., 2015; PERINA et al., 2018), além de contaminantes emergentes (drogas e medicamentos) (PEREIRA et al., 2016; PUSCEDDU et al., 2018; CORTEZ et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Como forma de identificar produtos químicos capazes de causar efeitos adversos à biota, legislações com concentrações de referência foram estabelecidas em nível mundial, assim como protocolos técnicos para identificar a presença de substâncias químicas na água e sedimento (CAHOON et al., 2016; TORO et al., 2016; BELLVER-DOMINGO et al., 2018; VANDERMARKEN et al., 2018; JAHAN & STREZOV, 2019). Porém, como forma de permitir análises mais completas sobre os efeitos dos contaminantes, se faz necessário à utilização de organismos como biomonitores, testes de toxicidade de sedimento e biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos, que fornecem informações sobre a integridade e funcionamento dos órgãos (MARINSEK et al., 2018; CRUZ et al., 2014; 2019; GONÇALVES et al., 2020).

Órgãos como brânquias e fígado são rotineiramente utilizados em trabalhos de contaminação ambiental, no caso das brânquias alterações histopatológicas são associadas aos efeitos agudos da contaminação, enquanto no caso do fígado a presença de patologias está associada a exposição crônica das substâncias químicas, como consequência de seu processo de metabolização (VAN der OOST, 2003; ZODROW et al., 2004; LOUIZ ET AL., 2018). Entretanto, além destes órgãos, o trato gastrointestinal (TGI), vem ganhando grande destaque, pois além de estar exposto aos contaminantes por via sistêmica, também tem contato com a dieta contaminada, no lúmen intestinal.

Devido a essas vias de exposição, a TGI caracteriza-se como um dos órgãos onde ocorre a maior acumulação de metais (MIJOŠEK et al., 2019). Merece destaque o fato de que, por meio da via alimentar os organismos podem ser expostos aos contaminantes pelo processo de bioacumulação, o que afeta principalmente os organismos topo de cadeia (CUI et al., 2011; PEREIRA et al., 2016; GRIBOFF et al., 2018; CRUZ et al., 2019).

Neste sentido, o TGI configura-se como uma barreira altamente seletiva, fundamental para a manutenção da homeostase dos organismos. Tal seletividade ocorre, pois ao mesmo

tempo em que é feito o bloqueio de agentes estressores, tais como, bactérias, vírus, parasitas e substâncias químicas vindas do meio exterior, é permitida a absorção de água, nutrientes e eletrólitos. São constituintes da barreira o epitélio colunar da mucosa, camadas de muco produzidas pelas células caliciformes, constituído por glicoproteínas e proteoglicanos, e rico em anticorpos, peptídeos e lisozimas, tecidos linfóides com células do sistema imune e sistema nervoso entérico (SNE) (ARTIS, 2008; TURNER, 2009; SALVO-ROMERO et al., 2015; OSBORNE et al., 2015; CAMARA-LEMARROY et al., 2018).

Para que a proteção e a manutenção da homeostase intestinal ocorram de maneira eficiente, é necessário o bom funcionamento das células da barreira intestinal, o que depende da manutenção de células funcionais e saudáveis. Nesse sentido, ocorre no epitélio intestinal o processo de *turnover*, responsável pela renovação das células da mucosa através da síntese de novas células, migração e extrusão. Essa renovação epitelial é constante, com novas células migrando pelas vilosidades até serem descartadas no lúmen, e adquirindo durante esse processo funções de digestão, absorção e secreção de mucinas. Tal processo é influenciado por diferentes fatores como a quantidade de fibras, dietas, parasitas, restrição alimentar e idade (APPLEGATE et al., 1999; UNI et al., 2000).

A camada de muco é de grande importância para a manutenção da homeostase intestinal, nesse sentido a espessura da camada é influenciada pela quantidade de células caliciformes, e tem como função além da defesa contra patógenos e agentes estressores, impedir que as enzimas digestivas destruam a mucosa (auto-digestão); lubrificação evitando danos com a passagem do alimento e a nutrição das bactérias da microbiota permitindo a sua colonização no intestino (LIEVIN-LE MOAL & SERVIN, 2006).

Há dois tipos de células caliciformes, sendo elas: caliciformes AB⁺, que secretam mucinas ácidas não sulfatadas ou sialomucinas (pH 2,5) e mucinas sulfatadas ou sulfomucinas (pH 1,0) responsáveis pela maior fluidez das fezes; e as caliciformes PAS⁺, que secretam mucinas neutras responsáveis pela maior proteção do epitélio, pois aumentam a viscosidade do muco (TREVIZAN et al., 2016). Alterações na constituição do muco pela quantidade desses dois tipos de caliciformes permite a melhor proteção do epitélio e a expulsão de agentes estressores como parasitas e contaminantes (FERRANDO et al., 2005; OSBORNE et al., 2015; TREVIZAN et al., 2016; HWANG et al., 2016; SHANG et al., 2021).

Contribuindo também para o funcionamento da barreira, há também os linfócitos intraepiteliais (IELs), que são predominantemente linfócitos T. Essas células são potentes

imunorreguladores, desempenhando mecanismos de vigilância resistentes a antígenos alimentares a microbiota local, sendo fundamentais para o processo de *turnover*, atuando na reparação e controle do crescimento das células epiteliais. Tais células tem como função proteger os órgãos de infecções, porém em algumas situações podem funcionar de maneira destrutiva contribuindo para o processo inflamatório, o que acarreta prejuízos a barreira intestinal (HAYDAY et al., 2001; CHEROUTRE; LAMBOLEZ; MUCIDA, 2011).

As substâncias químicas que chegam ao lúmen intestinal, perturbam constantemente o funcionamento da barreira impedindo, por exemplo, a renovação celular através do aumento da taxa apoptótica no epitélio e a perturbação da maquinaria celular (CHEAT et al., 2015; AWAD; ZENTEK, 2015; DELGADO; GRABINGER; BRUNNER, 2015). Essa perturbação pode causar a perda da eficiência da barreira intestinal, permitindo o aumento da permeabilidade e o acesso, através de vias irrestritas, de diferentes substâncias e patógenos ao restante do organismo (MASSEY; ARTEEL, 2012; PENDYALA; WALKER; HOLT, 2012; BISCHOFF et al., 2014; SALVO-ROMERO et al., 2015; ODENWALD & TURNER, 2017).

A exposição a contaminantes, tais como, micotoxinas, mercúrio, elsan, amônia, bisfenol e diversos outros presentes no ambiente, contribuem para esse aumento da permeabilidade intestinal, através da diminuição de proteínas de junção celular, edemas na lâmina própria, necrose de células epiteliais, danos no DNA e a diminuição de mecanismos antioxidantes. Essas alterações são descritas como precedentes da inflamação intestinal, e resultam também em alterações no comprimento das vilosidades e das camadas de musculatura, assim como na quantidade de células muco secretoras, causando prejuízos na absorção de nutrientes e excreção de enzimas (BANERJEE; BHATTACHARYA, 1995; ADESSO et al., 2017; de SOUZA; FIOCCHIL; ILIOPOULOS, 2017; MARTINI et al., 2017; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018; HUANG et al., 2018; MARINSEK et al., 2018).

Essas substâncias, como especial destaque para os metais podem afetar a saúde do TGI e de todo organismo causando a genotoxicidade por meio de duas diferentes vias, sendo a primeira por meio de uma interação direta com o DNA e indução de mutações; e a segunda por meio de alteração da sinalização celular como consequência do estresse oxidativo. Uma vez que os metais promovem aumentos nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), causando o estresse oxidativo, peroxidação lipídica, danos em DNA e alterações no metabolismo celular (WOO et al., 2009; MOAL & SERVIN, 2006; RAJESHKUMAR et al.,

2017), se faz necessário avaliações da Glutathione Reduzida (GSH) um tripeptídeo (g-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) que ocorre na forma reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), e das enzimas do sistema antioxidante, tais como, Glutathione S- Transferase (GST) e Glutathione Peroxidase (GPx), que combatem essas ROS (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A GPx caracteriza-se como uma enzima citosólica tetramérica, que depende do selênio e que emprega a GSH como cofator para então reduzir uma série de peróxidos aos álcoois correspondentes (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003), sendo extremamente importante para proteção das membranas contra a peroxidação lipídica e o aumento de sua atividade está relacionado a presença de diferentes contaminantes disponíveis induzirem a formação de H_2O_2 (AHMAD et al., 2006; FONSECA et al., 2011). A GSH em condições redox normais encontra-se mais na forma reduzida e está distribuída no núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrias, sendo um importante antioxidante não enzimático com grande papel na proteção contra as ROS (AHMAD et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009) e atuando como cofator da GPx e GST (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Por fim, a GST é fundamental na defesa contra o dano oxidativo e produtos peroxidativos de DNA e de lipídios, além de atuar na desintoxicação e excreção de metais pesados em conjunto com a peroxidase (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Porém, prejuízos ao funcionamento do TGI podem ter como origem alterações no funcionamento de outro integrante da barreira, a inervação intrínseca local composta pelo sistema nervoso entérico (SNE). Esse sistema é responsável pelo controle do peristaltismo, da secreção, absorção e fluxo sanguíneo local, de maneira independente das aferências centrais. Constitui-se por uma rede de neurônios e células da glia organizados em dois plexos principais, sendo eles: submucoso, inserido na camada de submucosa do intestino e mioentérico localizado entre as camadas de musculatura (GABELLA, 1987; GERSHON et al., 1993; FURNESS, 2006; FURNESS, 2012).

Avaliações do SNE são de grande relevância, pois juntamente com o sistema imune, podem dar os primeiros sinais da presença de contaminantes nos organismos (RISSATO et al., 2019). Nesse sentido, roedores e suínos expostos a dietas contendo fluoreto e bisfenol apresentaram diminuição da densidade neuronal, como consequência da morte de neurônios das subpopulações colinérgica (excitatória) e nitrérgica (inibitória), que juntos correspondem a 98% dos neurônios entéricos (SOUZA MELO et al., 2014; SZYMANSKA; GONKOWSKI, 2018; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018). No caso dos peixes avaliações

do plexo mioentérico são necessárias uma vez que, diferente dos mamíferos, o plexo submucoso desses animais de maneira geral é ausente ou pouco desenvolvido, tendo todas as funções do intestino controladas pelo plexo mioentérico (OLSSON, 2009). Sabe-se, que há diferentes níveis de resistência das subpopulações neuronais entéricas aos agentes estressores, e que no caso das duas mais comuns, a subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) apresenta maior resistência a fatores estressantes como a exposição a contaminantes, em virtude do neurotransmissor óxido nítrico (NO) (DIAMANTE et al., 2014; SOUZA MELO et al., 2017; MARINSEK et al., 2018). Porém, outras subpopulações com menores densidades possuem neurotransmissores com características neuroprotetoras como, por exemplo, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), galanina, substância P e peptídeo de transcrição regulado por cocaína e anfetamina (CART) (SOUZA MELO et al., 2017; SZYMANSKA; GONKOWSKI, 2018; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018).

Especialmente, no caso de peixes de regiões estuarinas intensamente antropizadas, a diminuição da densidade geral de neurônios mioentéricos (principalmente colinérgicos) foi observada (MARINSEK et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020). Porém, assim como o restante do TGI o SNE possui grande potencial plástico, o que permite a manutenção de seu funcionamento e da homeostase do organismo durante seu ciclo de vida.

Modificações na morfologia da rede neuronal, como forma de aumentar a comunicação e o número de sinapses; modificações morfoquantitativas como consequência de mudanças na atividade metabólica e na expressão de neurotransmissores; mudanças de código químico e co-localização são exemplos de alterações que demonstram a eficiência dos neurônios entéricos como biomarcadores de contaminação (CORREIA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; DIAMANTE et al., 2014; SOUSA et al., 2014; KURNIK et al., 2015; SOUZA MELO et al., 2017; SZYMANSKA; GONKOWSKI, 2018; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018; MARINSEK et al., 2018; RISSATO et al., 2019; GONKOWSKI; GAJECKA; MAKOWSKA, 2020; GONÇALVES et al., 2020).

Baseado no fato de a via alimentar ser uma das principais rotas de exposição dos organismos aos contaminantes, e de que a barreira intestinal é altamente responsiva aos efeitos da contaminação, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade ambiental de três regiões do litoral do paulista com diferentes níveis de ação antrópica, e investigar como a barreira intestinal se comporta nessas regiões. Para tanto foram quantificados e integrados os biomarcadores bioquímicos (GST, GPx, GSH, LPO, dano em DNA) e

morfológicos (espessura das camadas estratigráficas, células caliciformes AB⁺ e PAS⁺ e IELs) nos intestinos de bagres *Genidens barbus* coletados em três estuários distintos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animal Modelo

O presente trabalho utilizou juvenis da espécie de bagre cinza *Genidens barbus*, que apresenta ampla distribuição geográfica, sendo comum em toda costa sul e sudeste do Brasil (FIGUEIREDO; MENEZES, 1978). Os juvenis de bagre residem no interior dos estuários até a maturação sexual, época em que realizam a migração para o oceano. Apresentam como característica alimentar o fato de serem generalistas e apresentarem variação ontogenética em sua dieta, alimentando-se de presas maiores conforme aumentam o seu tamanho corporal.

De maneira geral os bagres *G. barbus* apresentam hábitos alimentares semelhantes às demais espécies de bagres, com dieta composta por crustáceos, equinodermos, pequenos peixes, misidaceos e copepodes (MISHIMA, TANJI, 1982; ARAUJO, 1984; MENDOZA-CARRANZA; VIEIRA, 2009; DENADAI et al., 2012), tendo os camarões *Xiphopenaeus kroyeri* e *Farfantepenaeus sp.*, e os peixes *Porichthys porosissimus* e *Conodon nobilis* (DI BENEDITTO; TAVARES; MONTEIRO, 2018) como algumas de suas principais presas. Além disso, por serem bentofágicos generalistas, os bagres *G. barbus* podem ser expostos a substâncias químicas presentes no sedimento por meio da ingestão.

2.2. Áreas de Estudo

Os animais foram coletados em três áreas estuarinas do litoral do estado de São Paulo que apresentam diferentes níveis de interferência antrópica, sendo elas: Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (24°26'16''S/47°04'16''W), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (25°00'59''S/47°55'29''W) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV)(23°59'04''S/46°24'02''W) (Figura 1).

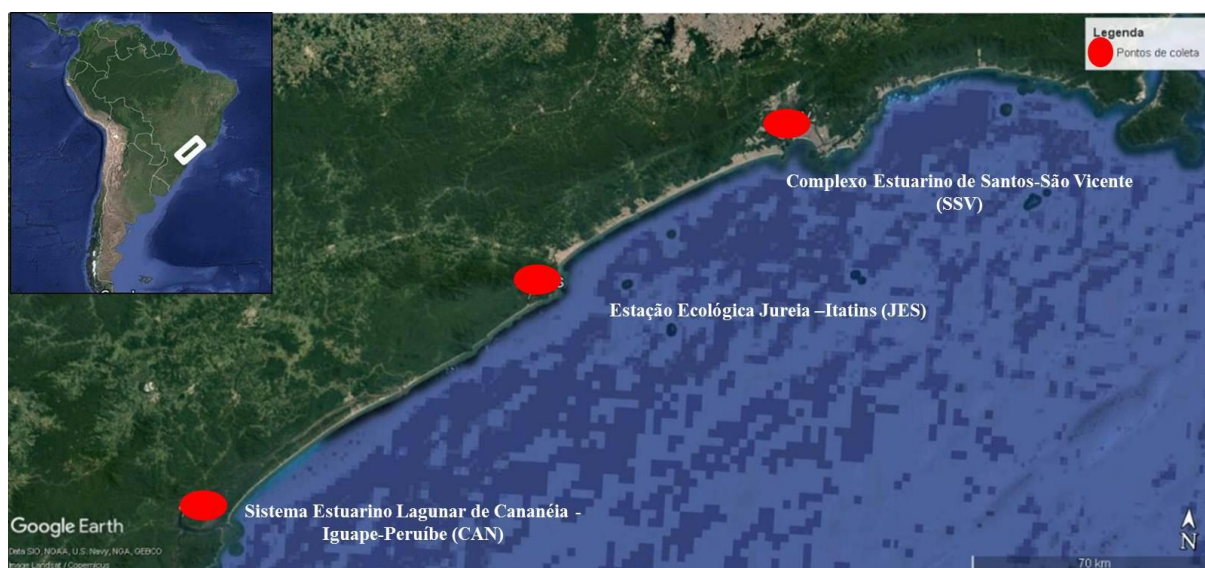


Figura1. Mapa da região costeira do litoral do Estado de São Paulo, com destaque para as três áreas de coleta: JES (Estação Ecológica Jureia-Itatins), SSV (Complexo Estuarino de Santos-São Vicente) e CAN (Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe).

Considerando as mudanças ambientais ocorridas nas estações do ano, principalmente em relação aos índices de pluviosidade, as coletas dos animais e sedimento nas três áreas foram padronizadas para ocorrer conjuntamente, no período de outono e inverno entre os meses de maio a julho de 2019.

2.3 Análises sedimentológicas e dos parâmetros físico químicos

2.3.1. Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada a partir do método descrito por MCCAVE & SYVITSKI (1991) onde foram pesadas 3 alíquotas de 100 g de sedimento seco em estufa, para a realização do peneiramento, foi utilizado um conjunto de peneiras de diferentes diâmetros (seguindo a escala de phi), após o peneiramento foram pesados os sedimentos retidos em cada malha. Posteriormente os sedimentos foram divididos nas porções grosso ($>125\mu\text{m}$) e fino ($<125\mu\text{m}$).

2.3.2. Análise de Matéria Orgânica

Para a determinação do teor de matéria orgânica (M.O) (ASTM, 2000) foram pesadas 3 alíquotas de 10 g de sedimento seco, em cadinhos de porcelana secos e com peso já

determinado pesados. Em seguida os mesmos foram colocados em mufla a 500°C por um período de 3 horas, posteriormente, essas amostras foram deixadas em dessecador para resfriar. Após atingirem temperatura ambiente, as amostras foram pesadas e a diferença de peso obtida entre o peso inicial e o peso final foi o teor de matéria orgânica da amostra.

2.3.3. Análise do teor de carbonato

O teor de carbonato de cálcio (CaCO_3) foi determinado a partir do método descrito por HIROTA & SZYPER (1975), sendo pesadas 3 alíquotas de 30 g de sedimento seco, colocadas em ácido clorídrico (HCl) 15% cobrindo toda amostra por um período de 24 h. Posteriormente a amostra foi lavada em papel filtro (seco em estufa e pesado em balança anteriormente) com água destilada e colocada em estufa a 60 °C para secar por um período de 48 h, após estes procedimentos o papel filtro com a amostra foi pesado e a diminuição de peso da amostra inicial para a final após a digestão ácida foi o teor de CaCO_3 das amostras.

2.3.4 Quantificação de metais e arsênio no sedimento

Nas três áreas de estudo, no mesmo local de coleta dos animais, amostras de sedimento foram coletadas com um amostrador de garra Van Veen de aço inoxidável de 0,036m². Tais amostras foram armazenadas em potes plásticos e mantidas refrigeradas durante o transporte, até serem armazenadas em geladeira 4°C, até a análise.

Todas as amostras foram liofilizadas e homogeneizadas para análises posteriores. A análise dos elementos traços foi realizada seguindo SW 846 US EPA 350b (USEPA, 1996). Esse método consiste na lixiviação ácida para dissolver todos os elementos disponíveis no ambiente, como a matéria orgânica, os carbonatos e os óxidos de Fe / Mn e adsorvidos em partículas de grão fino. Essa digestão não considera os metais da estrutura do grão, mas somente a fração potencialmente biodisponível.

A quantificação dos elementos As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb e Zn, bem como elementos próximos ao tamanho de partícula, como Al, Fe, Sc e V, foi realizada por espectrometria óptica por plasma acoplada indutivamente (ICP-OES), que fornece uma quantificação multielemental com base no comprimento de onda de cada elemento.

O controle de qualidade foi realizado considerando os limites de detecção, veracidade e precisão. Um material de referência certificado (SS-2 EnviroMat Contaminated Soil from SCP Science) foi submetido ao mesmo procedimento analítico e os resultados apresentaram um desvio padrão relativo de <15% e recuperação entre 88% e 109% para todos os elementos.

2.3.5 Análise dos parâmetros físico-químicos da água

Em decorrência dos processos de mistura das massas de água, os corpos estuarinos não são homogêneos, ocorrendo variações ao longo de escalas de tempo e em dimensões que variam de microscópicas até geométricas, afetando a salinidade, dispersão de nutrientes e sedimentação (MIRANDA; de CASTRO; KJERFVE, 2001; VIJITH; SUNDAR; SHETYE, 2009). Avaliações dos fatores físico-químicos são, portanto, relevantes, uma vez que fatores como salinidade da água, matéria orgânica dissolvida e pH interferem na adsorção de elementos metálicos (VIEIRA et al., 2021), e são fatores limitantes para os organismos, uma vez que proporcionam desafios para a sua sobrevivência e dispersão.

Amostras de água das três regiões de estudo foram analisadas em relação a temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido (OD) e pH. A temperatura e o OD foram medidos por meio de um medidor com sonda multiparâmetro, quanto ao pH a medição foi realizada através da utilização de papel indicador de pH, e a salinidade com o auxílio de refratômetro/salinômetro manual.

2.4 Coleta dos animais e Determinação do Fator de Condição (FC)

2.4.1 Coleta dos animais

Em cada região (JES, SSV e CAN) foram coletados 10 exemplares juvenis de bagres por meio de pesca artesanal, redes de arrasto e pesca por tarrafas. Posteriormente, os animais foram transferidos em caixas plásticas, com bombas de aeração e água do local da coleta para o laboratório de pesquisa no IB-CLP. No laboratório, com o intuito de minimizar o estresse de captura, os animais foram aclimatados durante o período de 12h. Durante esse período foram mantidos em jejum, com temperatura e salinidade da água monitoradas.

Após o período de aclimação, os animais foram eutanasiados em solução de benzocaína a 50ppm (diluída em 10ml de acetona) em solução aquosa, em dosagem excessiva suficiente para a completa cessação dos movimentos operculares e parada respiratória. Posteriormente, foi feita a pesagem (g) e mensuração padrão do comprimento corpóreo (cm) e uma incisão ventral mediana da região cloacal até a região das brânquias para a coleta do intestino.

Antes do processamento, os segmentos intestinais foram decalcados em papel branco para determinação do comprimento (cm) e área intestinal (cm²). A mensuração se fez necessária para evitar que as diferenças na área intestinal possam induzir ao erro na

interpretação da análise quantitativa dos neurônios. Caso ocorram alterações significativas no tamanho da área intestinal, será aplicado um fator de correção dado pela razão entre as áreas intestinais dos animais das diferentes regiões de estudo (GABELLA, 1969).

2.4.2 Determinação do Fator de Condição (FC)

Para determinar o Fator de Condição (FC) dos animais das três áreas de estudo foi utilizado os valores de peso e comprimento corporal. Tais valores foram aplicados na equação. Adquirir os valores de FC é de extrema importância, pois é utilizado para determinar o estado de bem-estar de um organismo em seu ambiente (LE CREN, 1951).

$$K = W_t / L_t^b$$

Onde:

W_t : peso total;

L_t : comprimento total;

b: coeficiente da relação peso-comprimento

2.5 Análise histológica da parede intestinal

Fragmentos de dois cm do intestino foram fixados em formol 10% por 24 horas e posteriormente transferidos para o álcool etílico a 70% até o processamento. Na sequência as amostras foram desidratadas em uma sequência de álcool até o absoluto, diafanizados em xilol e incluídos em cera de parafina, onde foram obtidos cortes transversais semi-seriados de 5µm de espessura.

Os cortes foram corados pelas técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE) para a avaliação completa da estratigrafia das camadas intestinais, altura das vilosidades (µm) e espessura da submucosa e túnica muscular (µm). Para a contagem de linfócitos intra-epiteliais (IELs), enterócitos e células mucossecretoras (caliciformes AB⁺ e PAS⁺) os cortes foram corados com Ácido Periodico de Schiff e Alcina Blue.

Considerando o formato cilíndrico do intestino, os cortes histológicos (três por animal) foram divididos em quadrantes (0°, 90°, 180°, 360°) (figura 2), totalizando 12 fotomicrográficas por animal. Para medir a altura das vilosidades intestinais (µm) e da espessura da túnica muscular (µm) foi utilizado o aumento de 100X. Já para a contagem de

células caliciformes e IELs o aumento utilizado foi de 1000X. Posteriormente a razão entre caliciformes/enterócitos e IELS/enterócitos foi estabelecida.

Para que as análises fossem realizadas, os cortes foram fotografados com o auxílio da câmera digital Motic Image® e as fotografias transferidas para o computador. A avaliação da estratigrafia intestinal e a quantificação das células caliciformes e IELs foi realizada com auxílio do programa Image Pro-Plus 3.0.1.

2.6. Avaliação morfoquantitativa dos neurônios mioentérico

2.6.1. Detecção da população neuronal geral (Giemsa) (BARBOSA, 1979)

Parte dos segmentos intestinais foi preenchido com solução fixadora (Giemsa) e tiveram suas pontas amarradas antes de serem imersos na mesma solução por sete dias. Posteriormente, cada intestino foi seccionado ao longo do eixo longitudinal na margem mesentérica e microdissecado em estereomicroscópio, para retirada das túnicas mucosas e submucosas e preservação das camadas musculares e serosas. As camadas preservadas formaram os preparados de membrana, que foram expostos ao corante Giemsa contendo azul de metileno em tampão fosfato a 0,1N (pH 6,9) por 24 horas e posteriormente montadas entre a lâmina e a tampa de vidro com resina sintética Permount®.

2.6.2. Detecção da população neuronal nitrérgica (NADPH-dr+) (SCHERER-SINGLER et al., 1983)

Parte dos segmentos intestinais foi lavado e preenchido com solução de PBS (ph 7,4). Posteriormente foram fixados em paraformoldeído 4% em PBS por 30 minutos, imersos em Triton X-100 por 10 minutos e lavado três vezes em PBS (10 minutos cada). Em seguida os segmentos foram incubados em meio de reação contendo, NBT, β -NADPH, 0,3% de Triton-X e Tris-HCl, para posteriormente serem fixados novamente em paraformoldeído 4%. Após período de fixação, cada intestino foi microdissecado em estereomicroscópio, para a elaboração de preparados de membrana, que foram montados entre lâmina e lamínula de vidro, com resina sintética Permount®.

2.6.3. Detecção da população neuronal metabolicamente ativa (NADH-dr+) (GABELLA, 1969).

Parte dos segmentos intestinais foram lavados e preenchidos com solução de Krebs (pH 7,3). Após a lavagem, os segmentos foram submetidos ao procedimento para evidencição dos neurônios. Para tanto, os segmentos passaram por duas lavagens de dez minutos cada em solução de Krebs, e foram incubados em solução de Krebs contendo Triton X-100 a 0,3% durante cinco minutos. Mais quatro lavagens de dez minutos em cada solução de Krebs foram realizadas, para posterior incubação em meio de reação constituído por 25ml de solução estoque de Nitro Blue Tetrazolium (NBT, solução estoque com concentração de 0,5 mg/ml), 25 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M; pH 7,3), 0,05 g de β -NADH em 50ml de água destilada. O tempo de incubação foi padronizado em 40 minutos e a reação histoquímica foi acompanhada em estereomicroscópio com segmentos posteriormente sendo fixados em solução de formol aldeído a 10% em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3). Após período de fixação, cada intestino foi microdissecado em estereomicroscópio, para a elaboração de preparados de membrana, que também foram montados entre lâmina e lamínula de vidro, com resina sintética Permount[®].

2.6.4 Análise morfoquantitativa dos neurônios mioentéricos

Após a fixação os intestinos foram microdissecados em estereomicroscópio, com auxílio de uma pinça de microdissecção. Esse procedimento é feito, no intuito de se retirar as camadas de mucosa e submucosa, mantendo apenas as musculaturas, formando assim os preparados de membrana.

A quantificação neuronal por área (mm²) foi realizada por meio desses preparados de membrana. A densidade neuronal foi obtida com o auxílio do microscópio de luz (objetiva de 40X), sendo as imagens capturadas pela câmera digital Motic Image[®], e transferidas para o computador. Para cada preparado de membrana foi adaptado um sistema teste constituído por 60 campos equidistantes percorrendo toda a sua extensão (regiões mesentérica, intermediária e antimesentérica).

A mensuração da área dos perfis do corpo celular (PC) e nuclear (PN) dos neurônios mioentéricos do intestino (μ m²) foi realizada pelo programa de análise de imagem computadorizado Image-Pro-Plus 3.0.1. Para tanto, as imagens capturadas para a análise quantitativa foram utilizadas na análise morfométrica, sendo mensurados 100 neurônios de cada um dos preparados de membrana. Os perfis dos PC e PN tiveram suas áreas separadas em quatro classes de tamanho. No caso das áreas dos PC, os intervalos foram estipulados em

0-30 μm^2 , 30-60 μm^2 , 60-90 μm^2 e 90-120 μm^2 , enquanto no caso dos PN foram de 0-15 μm^2 , 15-30 μm^2 , 30-45 μm^2 e 45-60 μm^2 .

2.7. Análises Bioquímicas

A atuação do sistema antioxidante intestinal dos animais foi avaliada utilizando os biomarcadores de exposição Glutathione S- Transferase (GST), Glutathione Peroxidase e Glutathione Reduzida (GSH), além dos biomarcadores de efeito peroxidação lipídica (LPO) e danos de DNA (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Fragmentos intestinais foram mantidos em gelo e homogeneizados a 10% massa:volume (m:v), em tampão Tris-HCl (Tris 50 mM; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; Surose 50 mM; KCl a 150 mM, PMSF 1 mM, pH 7,6). Alíquotas dos homogenatos foram então separadas para quantificação de dano em DNA e lipoperoxidação (LPO).

O restante da amostra foi centrifugado a 12.000 g durante 20 min a 4 °C, e alíquotas deste sobrenadante foram separadas para as análises de atividade de glutathione-S-transferase (GST), da glutathione peroxidase (GPx) e quantificação de tióis não proteicos (glutathione reduzida, GSH). As atividades da GST (KEEN et al., 1976) e da GPx (SIES et al., 1979) foram determinadas por espectrofotometria a 340 nm. Níveis de GSH foram medidos por espectrofotometria a 415nm (SEDLAK E LINDSAY, 1968).

Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram quantificados pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBAR) proposto por Wills (1987), através de fluorescência (λ_{ex} 532nm e 556nm λ_{em}). O método empregado para avaliação dos danos em DNA foi o da precipitação alcalina (GAGNÉ E BLAISE, 1995). O ensaio é baseado na precipitação do DNA genômico ligado às proteínas através do SDS (dodecil sulfato de sódio), deixando livre no sobrenadante as quebras simples na cadeia de DNA-proteína. Estes filamentos de DNA foram quantificados utilizando fluorescência (λ_{ex} 360nm e 450nm λ_{em}) após coloração com corante Hoescht. Soluções padrão de DNA de espermatozoário de salmão foram usadas para calibração.

Todas as análises foram normalizadas pelas concentrações de proteína, as quais foram por sua vez determinadas por espectrofotometria a 595nm (BRADFORD, 1976) utilizando BSA (proteína albumina do soro bovino) como padrão. As leituras de absorvância e fluorescência foram realizadas em leitor de microplacas (Biotek-Synergy TM HT).

2.8. Análise estatística

2.8.1. Correlação de Pearson

No programa Microsoft Excel foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson entre as variáveis de peso e comprimento corpóreo; e PC e PN dos animais das três áreas de estudo. Esse coeficiente mede o grau de correlação entre duas variáveis, ou seja, a dependência entre elas. O grau de correlação pode variar no intervalo de -1 a 1, o que demonstra se as variáveis aumentam conjuntamente ou inversamente.

De acordo com o grau de dependência das variáveis relacionadas (peso/comprimento e PC/PN) foi atribuído valores dentro do intervalo estipulado. Valores que se aproximaram de 1 representam uma correlação perfeita e positiva entre duas variáveis, ou seja, as duas variáveis analisadas apresentam a mesma tendência, aumentam juntas ou diminuem juntas. Valores próximos a 0 demonstram que as variáveis não apresentam correlação, não tendo dependência uma da outra. Por fim, valores próximos a -1 demonstram que as variáveis analisadas têm correlações perfeitas e negativas, sendo assim tem tendências contrárias, com uma aumentando e outra diminuindo.

2.8.2. Tratamento dos dados

Os resultados dos parâmetros biométricos, da espessura das camadas estratigráficas intestinais, quantidade de células caliciformes AB⁺ e PAS⁺, IELs, densidade neuronal e análise das áreas dos PC e PN dos neurônios nitrérgicos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade e ao teste de Levene para verificar a homocedasticidade. Os resultados foram analisados pelo teste de One-way ANOVA, e expressos em média $\pm$ desvio padrão com nível de significância de 5%.

A significância das diferenças entre os tratamentos foi avaliada também por meio da Análise Permutacional de Variância (PERMANOVA "*main test*") multivariada (ANDERSON, 2008), considerando as áreas de estudo como fatores fixos (JES, CAN e SSV). As variáveis da matriz multivariada foram normalizadas para que tivessem igual importância na análise. Quando o teste principal apresentou resultado significativo ($p < 0,05$), foi aplicado teste a posteriori ("*pairwise multiple comparisons test*") para identificar quais níveis diferiram entre si. A homogeneidade das variâncias foi analisada utilizando PERMDISP. Uma vez que o resultado da PERMANOVA é sensível à heterocedasticidade dos dados, em casos em que foi identificada, foi observado se as séries de dados, apesar da sua heterocedasticidade,

possuíam locação suficientemente distintas para corroborar uma eventual diferença significativa apontada pela PERMANOVA. Todos os testes foram realizados baseados em matrizes de semelhança de distâncias Euclidianas para os dados univariados e multivariados. Os resíduos foram permutados usando permutação irrestrita de dados brutos. Os valores de p Monte Carlo foram usados quando o número de permutações foi menores que 50 (ANDERSON et al., 2008). Para estas análises foi utilizado o software *PRIMER 6.0*.

Os resultados dos biomarcadores bioquímicos também foram integrados por meio do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) proposto por Liu et al. (2013). Para isso foram criados índices, a partir da normalização de cada valor de resposta de biomarcador individual, sendo realizado por subtração do valor médio geral e dividido por seu desvio padrão. Cada valor normalizado foi então adicionado ao valor mínimo obtido para cada biomarcador (escore Z). Os índices foram calculados, cada pontuação média do biomarcador Z foi então multiplicada por uma ponderação (DNA=2, LPO=2, GPx=1, GST=1, GSH=1, designado de acordo com a importância sistêmica de cada biomarcador. Os escores de resposta do biomarcador foram plotados como gráficos de radar. Para obter o índice integrado de resposta de biomarcador (IBR), a soma de todas as pontuações de resposta de biomarcador para cada tratamento foi dividida pela soma de todas as ponderações, fornecendo o grau final de efeito para cada tratamento.

A análise fatorial com análise de componentes principais (FA / PCA) foi utilizado como o procedimento de extração para destacar as associações entre as respostas do fator de condição, estratigrafia das camadas intestinais (altura da vilosidade, espessura da submucosa e espessura da musculatura), quantidade de caliciformes PAS⁺ e AB⁺, quantidade de IELs, densidade neuronal mioentérica da população geral e das subpopulações NADPH-dr⁺ e NADH-dr⁺, morfometria dos PC e PN da população geral mioentérica e das subpopulações NADPH-dr⁺ e NADH-dr⁺, danos em DNA, LPO e expressão de GPx, GSH e GST. As variáveis foram autoescaloadas (padronizadas) para terem igual importância.

Apenas fatores com autovalores maiores que 1,0 foram interpretados (critério de Kaiser). As variáveis selecionadas para interpretação foram aquelas associadas aos fatores com carregamento $\geq 0,60$, valor mais conservador que o corte de carregamento recomendado por Tabachnick e Fidell (1996). A relevância das associações observadas foi estimada pelo cálculo do fator de pontuação de cada caso para o centróide de todos os casos para os dados

originais. Todas as análises foram realizadas no software STATISTICA 12 (StatSoft Inc., EUA).

3. RESULTADOS

3.1 Parâmetros físico-químicos e caracterização do sedimento

Os animais foram coletados nas três áreas durante o período do inverno, entre os meses de Maio e Julho de 2019, para que assim as condições ambientais fossem semelhantes nas três localidades e não influenciassem nos resultados (tabela 1). Nesse sentido, as maiores variações foram encontradas em relação a salinidade, com JES apresentando os menores valores (15) e SSV os maiores (30).

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos (salinidade, temperatura, pH e oxigênio dissolvido na água) e caracterização do sedimento (granulometria, matéria orgânica (M.O) e carbonato) das áreas Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Parâmetros físico-químicos				
Região	Salinidade	Temperatura (°C)	pH	Oxigênio Dissolvido (mg/L)
JES	15	22,7	7	6,2
CAN	25	23,0	6	7,3
SSV	30	23,4	6	6,0
Caracterização do sedimento				
Região	Granulometria		M.O (%)	CaCO ₃ (%)
	Finos (%)	Grossos (%)		
JES	45,12%	59,45%	3,30%	3,29%
CAN	32,44%	67,75%	5,43%	4,61%
SSV	17,86%	82,43%	5,13%	25,65%

Nas três regiões de estudo o sedimento coletado foi predominantemente classificado como grosso (tabela 1). A região de SSV apresentou a maior porcentagem de sedimentos classificados como grossos (82,43%), enquanto JES apresentou a maior porcentagem de sedimento classificados como finos (45,12%).

As regiões de CAN e SSV apresentaram valores próximos de M.O (5,45% e 5,13%), que foram respectivamente 2,13% e 1,83% superiores aos encontrados em JES (tabela 1). Em SSV foi encontrado a maior porcentagem de carbonato (25,65%), que foi superior a de JES e CAN respectivamente em 22,36% e 21,04% (tabela 1).

3.2 Quantificação de metais no sedimento

Doze metais tiveram suas concentrações analisadas nas três áreas de estudo (tabela 2), porém apenas metade dos analisados tem valores de referência estipulados pela resolução CONAMA 454, não havendo valores referência para as concentrações de manganês (Mn), escândio (Sc), estrôncio (Sr), titânio (Ti) e vanádio (V) nas legislações utilizadas como referência.

Tabela 2. Concentração (mg/kg) de metais no sedimento das regiões Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Elementos	JES	CAN	SSV
	Cal. conc. (mg/kg)	Cal. conc. (mg/kg)	Cal. conc. (mg/kg)
As	4,78	1,96	3,88
Cd	0,19	0,04	0,20
Cr	12,68	2,98	12,32
Cu	4,29	103,46	7,19
Mn	76,48	55,86	89,93
Ni	5,12	10,87	4,11
Pb	6,73	78,01	5,31
Sc	1,95	0,37	1,21
Sr	22,93	7,87	245,89
Ti	92,75	59,22	134,66
V	15,34	3,94	9,61
Zn	21,90	187,12	38,98

Três metais violaram os valores guia de referência do primeiro nível propostos pelo Guia da Qualidade de Sedimento Dragado no Brasil (CONAMA, 454) e a Guias de Qualidade

de Sedimentos brasileira (CONAMA, 454) e canadense (EC, 2007) apresentando concentrações altamente elevadas em CAN, sendo eles: cobre (Cu), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Na comparação com a área referência (JES), as concentrações de Cu, Pb e Zn foram respectivamente 2306,98%, 1059,09% e 754,25% mais altas. As concentrações desses três metais também foram elevadas na comparação com SSV, sendo 1338,42% (Cu), 1367,52% (Pb) e 380,03% (Zn) mais altas em CAN (tabela 2).

Mesmo com as concentrações de Zn não sendo tão elevadas quando em CAN, a concentração encontrada em SSV chama atenção quando utilizamos como referência SQGs específicos. Da mesma maneira utilizando essas concentrações de referência locais, chama a atenção as concentrações de níquel (Ni) encontradas em SSV.

Também merece destaque as concentrações de estrôncio (Sr), apesar de não ser um metal com concentrações referência nas legislações foi encontrado elevada concentração SSV. Tal concentração foi 972,30% mais elevada do que a encontrada em JES e 3023,55% mais elevada do que a encontrada em CAN (tabela 2).

3.3 Parâmetros biométricos

Os bagres da área referência (JES) apresentaram maiores valores médios de comprimento corporal em comparação com os bagres das áreas antropizadas (CAN e SSV), sendo que as diferenças encontradas foram significativas ($p < 0,05$) (tabela 3). A diferença na comparação entre os animais de JES e CAN foi de 18,24%, e na comparação de JES e SSV foi de 35,81%. Os menores valores de comprimento corporal foram dos animais de SSV, sendo 72,64% menores que os animais de CAN ($p < 0,05$).

Tabela 3. Parâmetros biométricos (peso, comprimento corporal, área intestinal, fator de condição) expressões em média $\pm$ desvio padrão e Correção de Pearson entre as variáveis peso e comprimento corporal, dos bagres *Genidens barbatus* (n=10 por grupo) das áreas Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Região	Parâmetros biométricos				Correlação de Pearson (peso/comprimento)
	Peso (g)	Comprimento Corporal (cm)	Área intestinal (cm ²)	Fator de condição (FC)	
JES	114,36 $\pm$ 42,29 ^a	23,85 $\pm$ 2,48 ^a	13,22 $\pm$ 5,47 ^a	0,80 ^a	0,92
CAN	65,63 $\pm$ 26,21 ^b	19,50 $\pm$ 2,35 ^b	13,42 $\pm$ 5,08 ^a	0,85 ^a	0,95
SSV	28,73 $\pm$ 11,68 ^c	15,31 $\pm$ 2,11 ^c	10,70 $\pm$ 5,48 ^a	0,79 ^a	0,71

*letras diferentes na mesma coluna demonstram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de One Way ANOVA.

Entretanto, as diferenças mais expressivas foram nas comparações dos pesos médios dos animais, com os bagres de JES apresentando valores médios maiores que os animais de CAN e SSV ($p < 0,05$) (tabela 3). Nesse sentido, os bagres de JES tiveram seus pesos 42,62% maior que os de CAN e 74,88% maior que os de SSV. Assim como no comprimento, os animais de SSV apresentaram os menores valores de peso, sendo tais valores 56,23% menor que os bagres de CAN.

Utilizando a Correção de Pearson, foi observado dependência das duas variáveis nos bagres das três áreas de estudo. No caso dos animais de JES e CAN os valores das correlações foram de 0,92 e 0,95 respectivamente, caracterizando correlações positivas e muito fortes, enquanto nos animais de SSV a correlação apresentou o valor de 0,71, sendo classificada como positiva e forte (tabela 3) (figura 2).

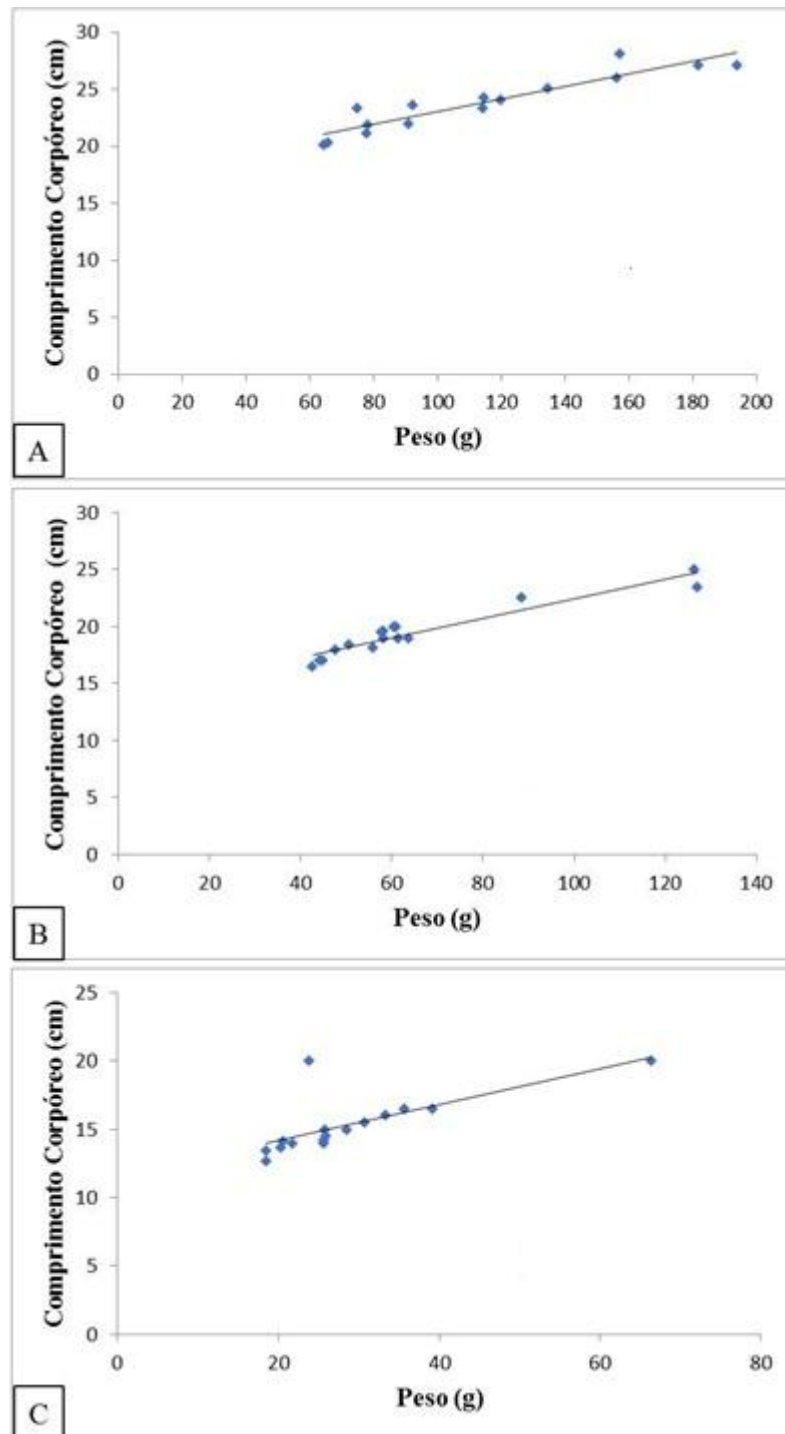


Figura 2. Correlação de Pearson dos valores de peso (g) e comprimento corpóreo (cm) dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (muito forte – $p = 0,92$), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (muito forte – $p=0,95$) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (forte – $p=0,71$).

Apesar dessas diferenças corpóreas, não ocorreu diferenças significativas ($p>0,05$) entre os FCs dos bagres das três áreas de estudo, demonstrando que os animais analisados tinham a mesma condição corporal (tabela 3). Também, não ocorreram diferenças significativas ($p>0,05$) na área intestinal, dispensando a necessidade da utilização do fator de correção para as análises morfoquantitativas do plexo mioentérico.

3.4 Análise histológica do intestino

As camadas estratigráficas do intestino de *Genidens barbatus* nas três regiões de estudo seguiram o padrão descrito para órgãos tubulares, com as camadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa (figura 3).

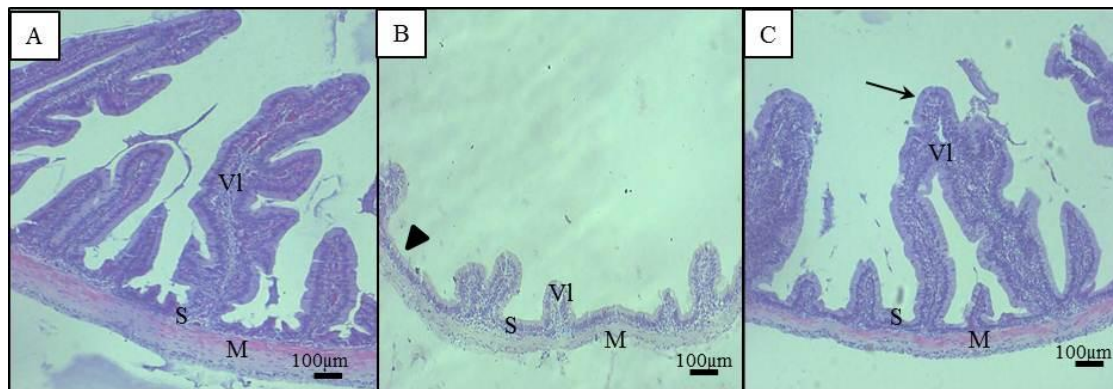


Figura 3. Fotomicrografia do intestino de bagres *Genidens barbatus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (B) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (C), indicando as vilosidades (VI), submucosa (S), musculatura (M), epitélio retilíneo (cabeça de seta) e vilosidades fundidas (seta).

Nos parâmetros morfométricos do intestino, diferenças significativas ($p<0,05$) foram encontradas (tabela 4) (figura 4). As diferenças mais expressivas foram em relação à altura das vilosidades, pois os bagres de JES (área referência) apresentaram vilosidades com alturas médias de 56,65% maior do que as alturas médias das vilosidades dos bagres de CAN ($p<0,05$). Porém, na comparação com os valores médios das vilosidades de SSV, as vilosidades dos bagres de JES foram 39,72% menores ($p>0,05$). Por fim, a maior diferença observada em relação às vilosidades foi na comparação entre CAN e SSV, com as vilosidades dos últimos estando 222,31% maiores (tabela 4) (figura 4).

Tabela 4. Espessura das camadas estratigráficas do intestino de bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Áreas	Vilosidades (µm)	Submucosa (µm)	Muscular (µm)	Parede Total (µm)
JES	313,14±150,16 ^a	13,21±4,54 ^a	85,33±35,52 ^a	411,68±143,74 ^a
CAN	135,75±27,15 ^b	12,67±3,92 ^a	61,12±21,12 ^{ab}	209,54±43,62 ^b
SSV	437,54±83,99 ^a	9,53±1,64 ^a	53,48±21,74 ^b	500,55±75,60 ^a

*Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

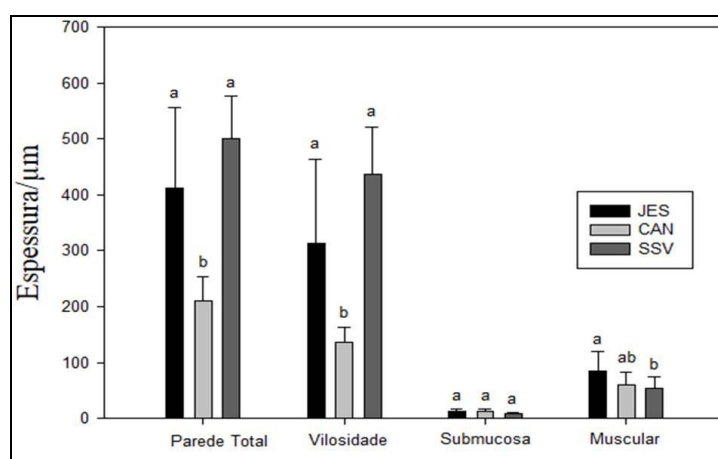


Figura 4. Representação gráfica da espessura das camadas da parede intestinal (µm²) dos bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). *Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

Durante as observações do intestino dos bagres de SSV foram encontradas inúmeras vilosidades fundidas nas bases e ápices (figura 3). Já no caso dos bagres de CAN, como consequência da menor altura das vilosidades, o epitélio apresentou em toda a sua extensão vilosidades achatadas em alguns animais (figura 3).

As diferenças observadas, principalmente na altura das vilosidades refletiram na espessura da parede total intestinal (figura 4). Sendo assim, a parede do intestino dos bagres de CAN apresentou a espessura 49,11% menor do que dos bagres de JES ($p < 0,05$). Essa menor espessura nos animais de CAN ocorreu também no comparativo com os bagres de

SSV, estando 58,14% menor ($p < 0,05$). Já na comparação entre JES e SSV não ocorreu diferenças significativas ($p > 0,05$) (figura 4).

Não foram observadas diferenças significativas na espessura da camada de submucosa entre os bagres das três áreas de estudo. Porém, diferenças foram observadas em relação à espessura da camada muscular do intestino dos bagres de JES e SSV, com os últimos apresentando a espessura menor 37,22% ($p < 0,05$). Nas comparações entre as musculaturas dos bagres de JES e CAN e CAN e SSV, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) (tabela 4) (figura 4).

Em relação às células caliciformes AB^+ e PAS^+ e IELs foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre os intestinos dos bagres das três áreas de estudo (tabela 5) (figuras 5 e 6).

Tabela 5. Relação Caliciformes AB^+ /Enterocitos, Caliciformes PAS^+ / Enterocitos e IELs/Enterocitos do intestino de bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Áreas	Caliciformes AB^+ /E	Caliciformes PAS^+ /E	IELs/E
JES	24,45±10,23 ^a	35,79±12,44 ^a	6,25±1,85 ^a
CAN	24,65±10,87 ^a	29,16±8,69 ^a	6,69±2,59 ^a
SSV	15,07±4,06 ^b	19,15±3,64 ^b	4,30±0,50 ^b

*Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

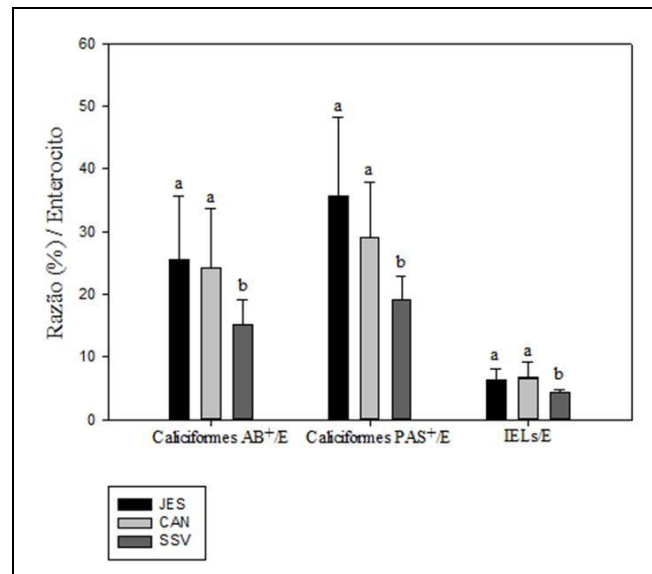


Figura 5. Representação gráfica das relações Caliciformes AB⁺/Enterócitos, Caliciformes PAS⁺/Enterócitos e IELs/Enterócito do epitélio intestinal dos bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). *Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

O intestino dos bagres de SSV apresentaram uma quantidade de caliciformes AB⁺ e PAS⁺ 38,37% e 46,5% menores do que a observada nos intestinos dos bagres de JES ($p < 0,05$). Os intestinos de SSV também apresentaram diferenças significativas em relação às caliciformes na comparação com os intestinos dos bagres de CAN, sendo observado nos de SSV quantidades de caliciformes AB⁺ e PAS⁺ respectivamente 37,84% e 20,74% menores do que as observadas em CAN ($p < 0,05$). Já na comparação entre os intestinos dos bagres de JES e CAN, não foi verificado diferença significativa ($p > 0,05$) (tabela 5) (figuras 5 e 6).

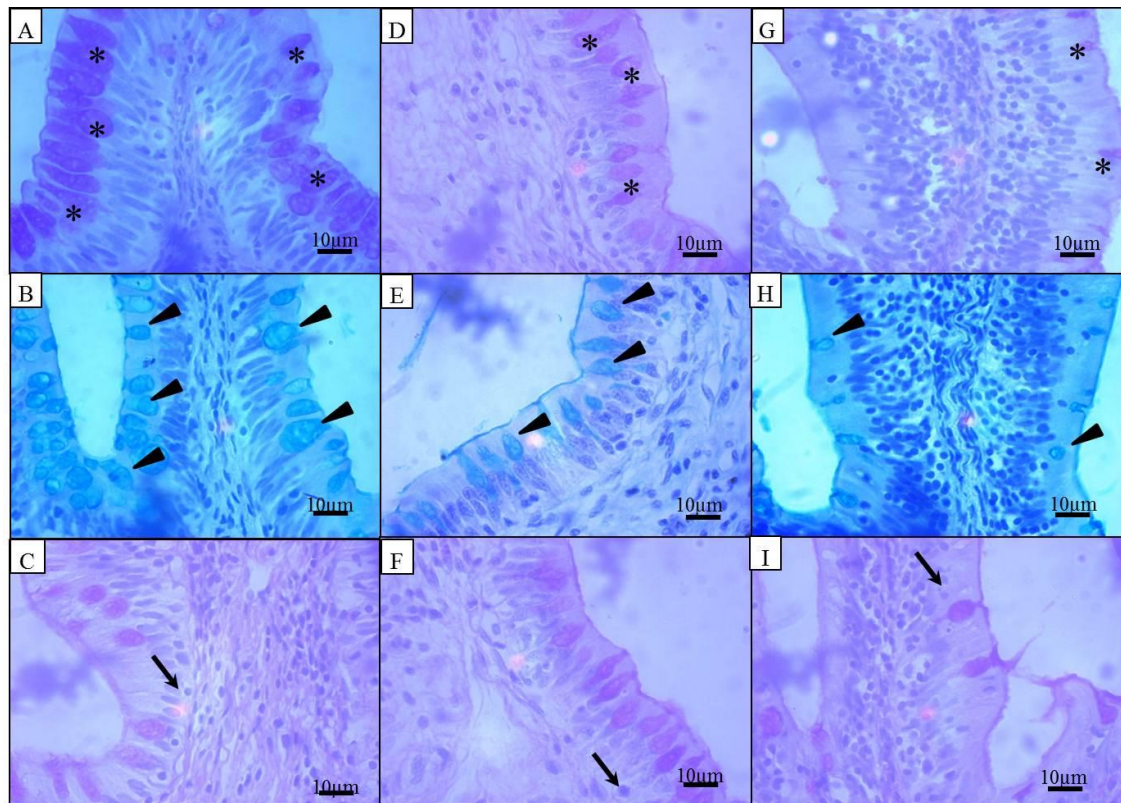


Figura 6. Fotomicrografia do intestino dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A, B e C), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (D, E e F) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (G, H e I). (*) células caliciformes PAS⁺ evidenciadas pela técnica de Reativo de Schiff, (cabeça de seta) células caliciformes AB⁺ evidenciadas pela técnica de Alcian Blue, (setas) Linfócitos Intra-epiteliais (IELs) evidenciados pela técnica de HE.

Diferenças também foram observadas na quantidade de IELs, com os intestinos dos bagres de SSV apresentando 31,2% menos IELs que os intestinos dos bagres de JES ($p < 0,05$). Os bagres de SSV apresentaram também 35,75% menos IELs que os dos animais de CAN ($p < 0,05$). Não ocorreram diferenças significativas entre as quantidades dessas células nos intestinos dos bagres de JES e CAN (tabela 5) (figura 5).

3.5 Análise morfoquantitativa do Plexo Mioentérico

O plexo apresentou morfologia semelhante nos animais das três áreas de estudo, com os neurônios distribuídos em uma rede neuronal extremamente difusa com cordões nervosos por toda a extensão da musculatura intestinal (figura 7). Não foram observados agrupamentos neuronais (gânglios).

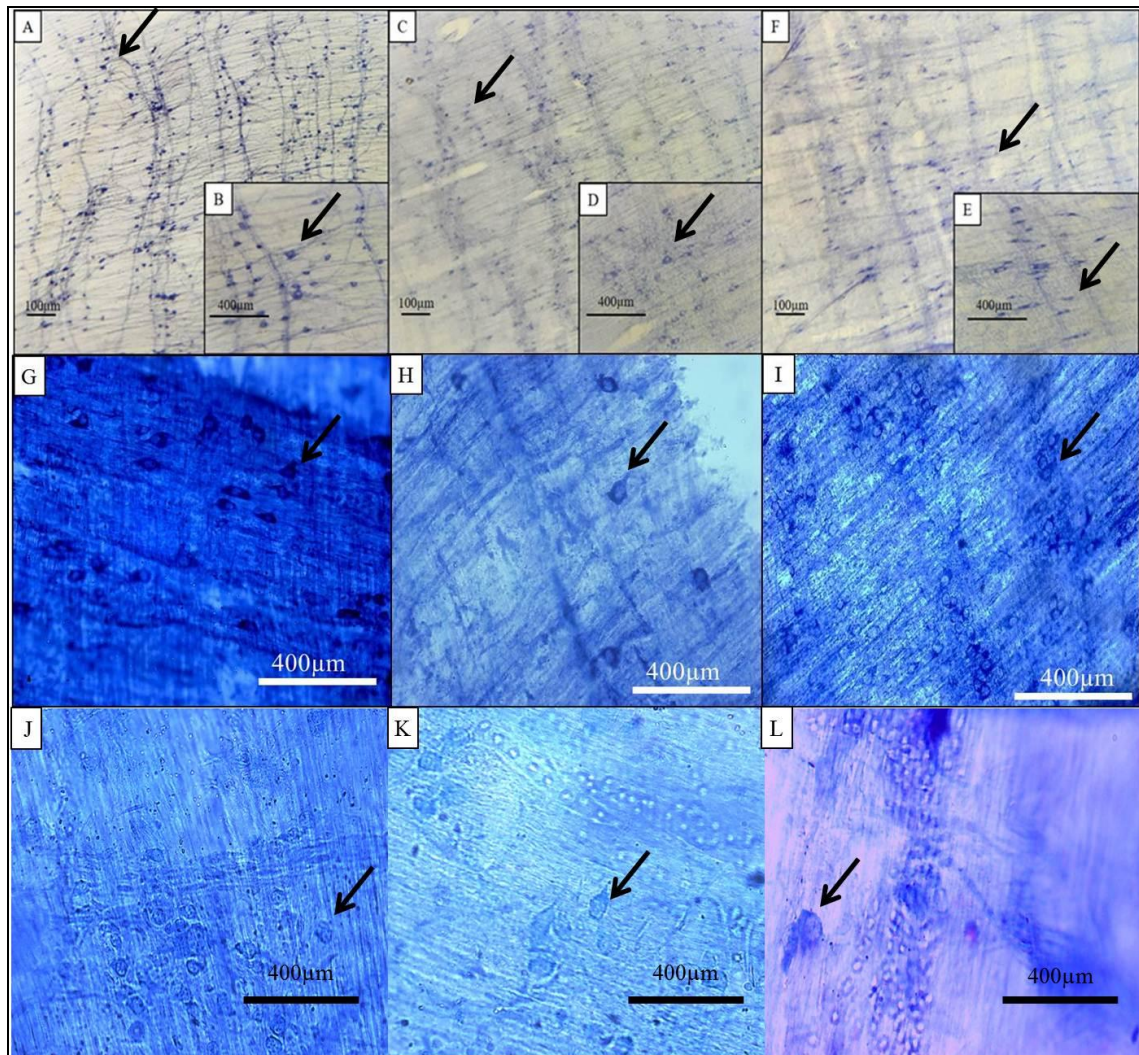


Figura 7. Fotomicrografia do plexo mioentérico de bagres *Genidens barbus*, da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A, B, G e J); Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (C, D, H e K) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (E, F, I e L), evidenciando as população neuronal geral (J, K e L), subpopulação nitrérgica (A, B, C, D, E e F) e subpopulação metabolicamente ativa NADH-dr⁺ (G, H e I).

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram observadas em relação a densidade da população geral de neurônios mioentéricos nos animais das três regiões de estudo. O plexo dos animais de CAN apresentou as maiores densidades neuronais, que foram 100,20% maiores do que as observadas em JES e 52,94% maior do que a observada no plexo dos animais de SSV. Os animais da última também apresentaram densidade 30,89% maior ($P < 0,05$), que a do plexo dos animais de JES (tabela 6) (figura 8). Não foram observadas

diferenças em relação a morfometria dos PC e PN no plexo dos animais das três regiões (tabela 6) (figura 9).

Tabela 6. Densidade neuronal/mm² e análise monométrica do perfil celular (PC) e nuclear (PN) da população neuronal geral mioentérica (Giemsa) e das subpopulações neuronais mioentéricas nitrérgica (NADPH-dr⁺) e metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) do intestino de bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Giemsa			NADPH-dr ⁺		NADH-dr ⁺	
Densidade (mm ²)						
JES	1359,99± 132,31 ^a		318,89± 24,04 ^a		1006,38± 15,74 ^a	
CAN	2722,76± 159,61 ^b		315,70± 57,51 ^a		749,36± 70,96 ^b	
SSV	1780,21± 277,93 ^c		350,40± 59,40 ^a		1184,05± 23,07 ^c	
Morfometria (µm ²)						
	PC	PN	PC	PN	PC	PN
JES	24,20±3,92 ^a	12,41±2,27 ^a	39,95±9,18 ^a	16,05±2,39 ^a	46,39± 8,57 ^a	15,31± 2,37 ^a
CAN	24,70±1,67 ^a	11,71±1,41 ^a	42,71±7,73 ^b	20,23±3,23 ^b	38,04±5,06 ^b	15,17± 1,32 ^a
SSV	24,45± 3,09 ^a	11,50± 1,65 ^a	36,52±7,05 ^a	18,04±3,34 ^{ab}	29,69± 2,58 ^c	12,77± 1,70 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna demonstram diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste de One Way ANOVA

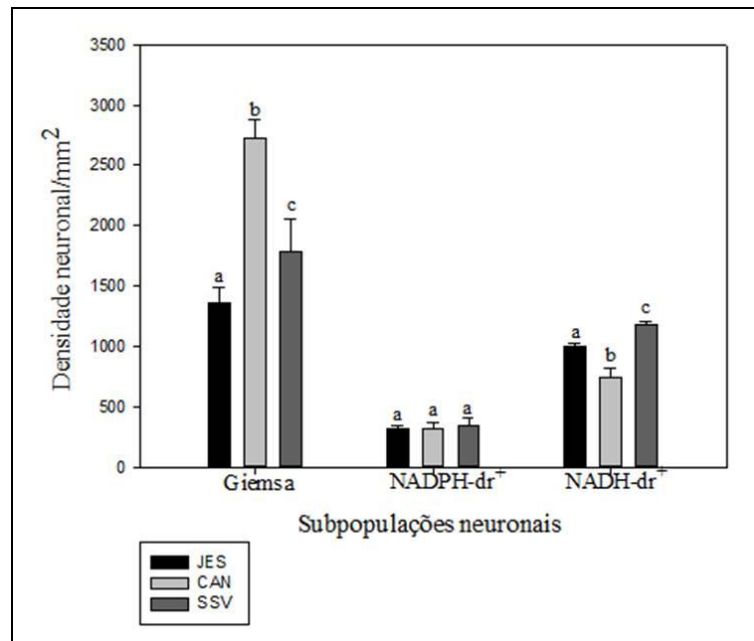


Figura 8. Densidade neuronal (mm^2) da população neuronal geral (Giemsa), subpopulação nitrérgica (NADPH-dr^+) e subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr^+) do plexo mioentérico do intestino de bagres *Genidens barbatus* ($n=10$ por região), coletados nas áreas Estação Ecológica Jureia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). *Letras diferentes demonstram diferença estatística significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

Diferente do que foi observado na população geral, não ocorreram diferenças significativas ($p > 0,05$) na densidade da subpopulação nitrérgica entre o plexo dos animais das três regiões de coleta. Contudo, diferenças foram observadas em relação à morfometria, com os neurônios nitrérgicos do plexo mioentérico dos bagres de JES apresentando área média dos PC 6,9% menor que os de CAN ($p < 0,05$) (tabela 6) (figura 9). Os neurônios da subpopulação nitrérgica apresentaram a área média dos PCs 16,94% maior que os de SSV. Já nas comparações JES e SSV não foram constatadas diferenças nas áreas médias dos PCs (tabela 6) (figura 9). Em menor proporção, foram notadas diferenças significativas na área média dos PNs, com os bagres de JES apresentando área média dos PNs 26,04% menor que os de CAN (tabela 6) (figura 10). Porém, nas comparações entre JES e SSV e CAN e SSV não foram observadas diferenças significativas nas áreas médias dos PNs ($p > 0,05$).

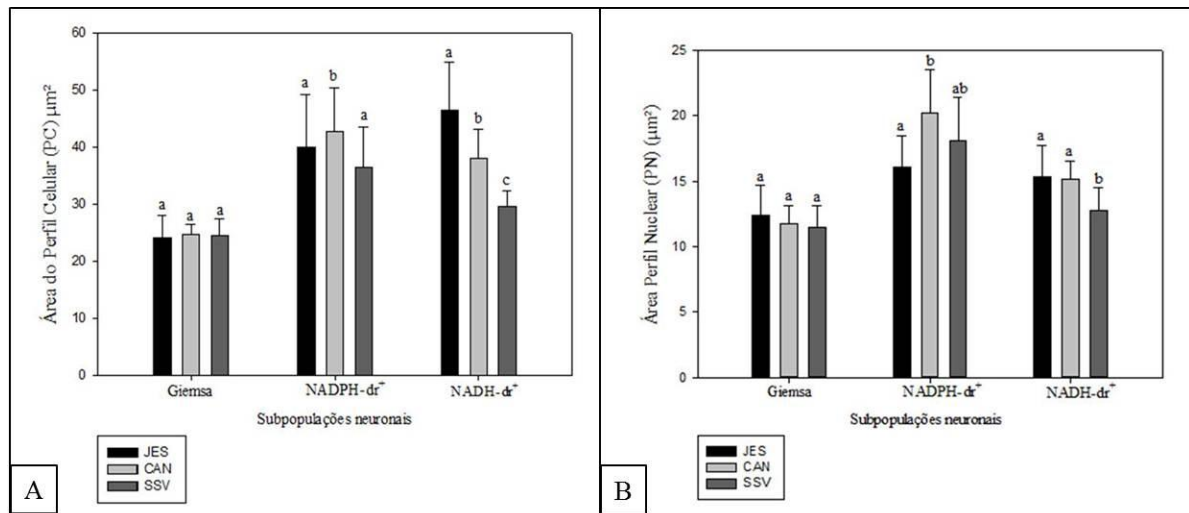


Figura 9. Perfil celular (PC) (A) e perfil nuclear (PN) (B) dos neurônios da população neuronal geral (Giemsa), subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) e subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) do plexo mioentérico do intestino de bagres *Genidens barbatus* coletados nas regiões Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). *Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

No que diz respeito a subpopulação metabolicamente ativa, diferenças foram observadas na comparação dos animais das três áreas de estudo. Essas diferenças se deram por uma densidade neuronal 25,54% menor ($p < 0,05$) no plexo dos bagres de CAN na comparação com JES, e 36,72% menor na comparação com SSV (tabela 6) (figura 10). Na comparação de JES com SSV, essa última apresentou aumento de 17,6% ($p < 0,05$). Em relação a morfometria, os neurônios metabolicamente ativos dos bagres de JES apresentaram áreas médias de PC 18% maiores que os de CAN e 36% maior que os de SSV ($p < 0,05$) (tabela 6) (figura 9). Os neurônios do plexo mioentérico dos animais dessa última região apresentaram as menores áreas médias de PC, sendo 21,96% menor que os de CAN (figura 9). No caso de SSV também foi observado menores áreas de PN na comparação com as demais áreas, sendo 16, 6% menor que a dos neurônios de JES e 19,78% menor que os de CAN (tabela 6) (figura 9).

Os valores do coeficiente de correlação de Pearson demonstram que as variáveis PC e PN crescem conjuntamente, ou seja, dependem uma da outra, em todas as populações neuronais analisadas. Em todas as regiões de estudos, as correlações foram classificadas como moderadas ou fortes. No caso esses resultados deixam explicito a tendência de aumento na

área corpo celular e núcleo dos neurônios da subpopulação nitrérgica. Já no caso de SSV esses resultados deixam explícito a tendência de diminuição da área dos neurônios da subpopulação metabolicamente ativa (figura 10).

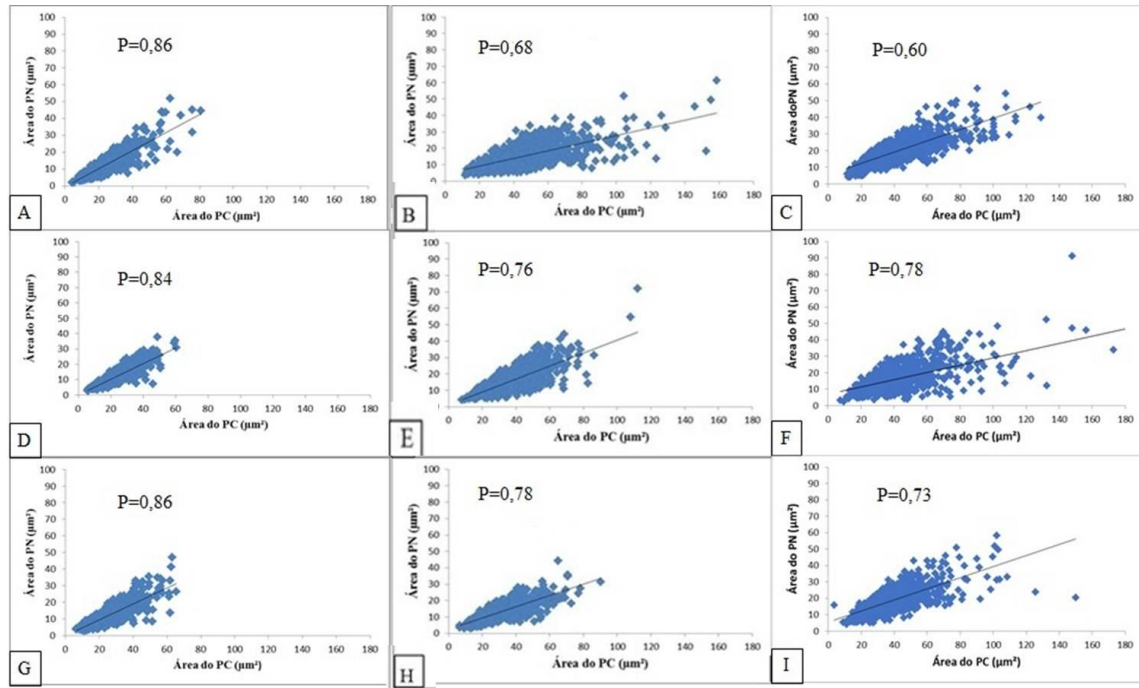


Figura 10. Correlação de Pearson dos valores de PC e PN dos neurônios mioentérico da população geral (Giemsa) (A, D e G), subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) (B, E e H) e subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) (C, F e I) dos bagres *Genidens barbus* (n=10 por região) da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES) (A, B e C), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (D, E e F) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (G, H e I). Correlação forte (A,D,E,F,G,H e I) e correlação modera (B e C).

Os resultados das análises do histograma de frequência, foram complementares, não sendo observado diferenças significativas na distribuição dos neurônios da população geral nas classes de PC e PN em nenhuma das regiões estuarinas analisadas (figura 11). Em relação à área média dos PCs dos neurônios da subpopulação NADH-dr⁺, percebe-se, que apenas nos bagres de JES existe a classe 90-120 (µm²), o que evidencia os maiores valores de áreas nesses animais (figura 11). Outra análise, que demonstra a maior frequência de neurônios com áreas maiores em JES, é que os neurônios mioentéricos dessa última, ocuparam com mais

frequência a classe 60-90 (μm^2) em comparação com CAN e SSV, sendo nessas duas últimas encontrado 12,14% e 15,64% , respectivamente menos neurônios nessa classe.

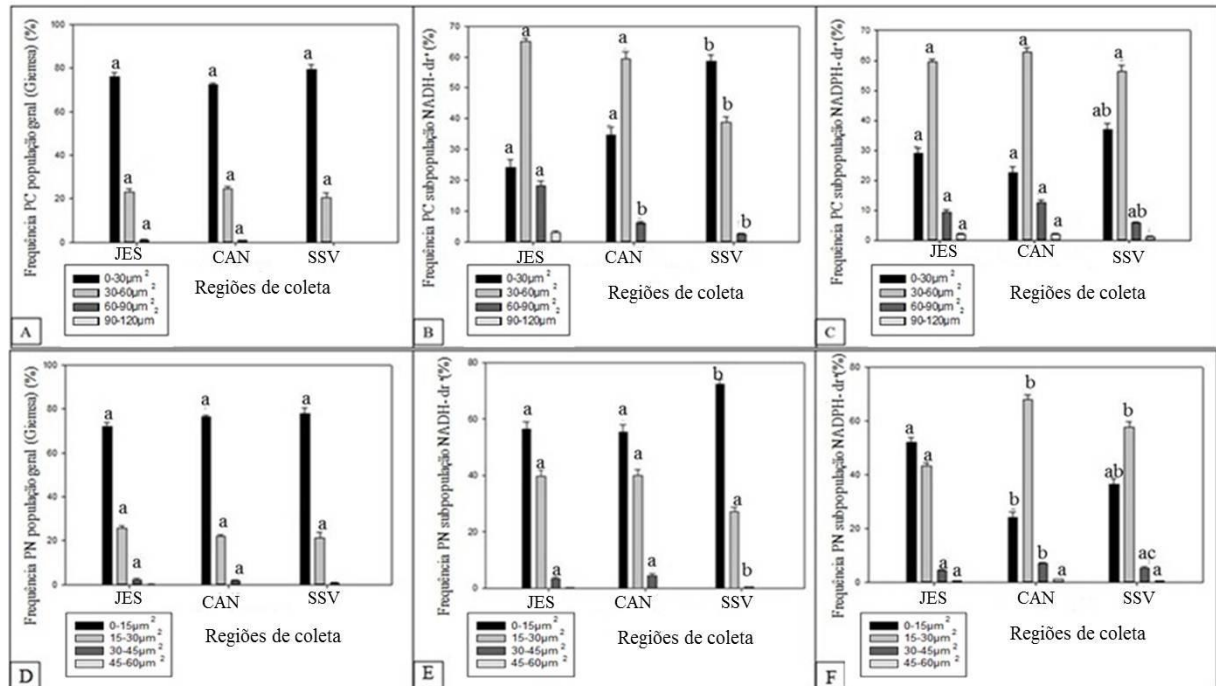


Figura 11. Histograma de frequência dos perfis celular (PC) e nuclear (PN) dos neurônios da população neuronal geral (Giemsa) (A e D), subpopulação metabolicamente ativa (NADH-dr⁺) (B e E) e subpopulação nitrérgica (NADPH-dr⁺) (C e F) do plexo mioentérico do intestino de bagres *Genidens barbus* coletados nas áreas de Estação Ecológica Jureia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). Nas comparações entre as classes de PN letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

Porém, os resultados mais expressivos no histograma de frequência de PC da subpopulação metabolicamente ativa, concentraram-se em SSV, pois há o predomínio de neurônios com áreas de PC na classe 0-30 (μm^2) (58,67% de todos os neurônios) e uma menor frequência na classe 30-60 (μm^2), sendo essa frequência 15,83% menor que a de JES e 20,6% menor que CAN (figura 11). Tais resultados, auxiliam a perceber o predomínio de neurônios com menores valores de áreas em SSV.

Em relação ao histograma de frequência do PN da subpopulação NADH-dr⁺, percebe-se que em JES, há a existência da classe 45-60 (μm^2), que apesar de representar apenas 0,25% dos núcleos de JES, não está presente em CAN e SSV, essa última, apresentou os menores

valores médios de PN (figura 11). Porém, os resultados que merecem maior destaque, são o fato de que em SSV, há maior frequência de núcleos na classe 0-15(μm^2) (15,89% maior que JES e 16,89% maior que CAN) ao mesmo tempo, que uma frequência menor na classe 15-30(μm^2) (12,63% menor que JES e 12,88% menor que CAN) (figura 12).

Os resultados dos histogramas de frequência também foram complementares no caso da subpopulação NADPH-dr⁺. Em relação à área do PC 14,28% mais neurônios foram classificados na classe de 0-30 μm^2 e 6,92% a menos na classe 60-90 μm^2 em SSV, quando comparado com CAN (figura 11). Isso demonstra a maior frequência de neurônios com áreas de PC maiores em CAN, como já havia sido apontado, anteriormente.

Em relação ao histograma de frequência dos PN, os resultados deixam explícito a maior área de PN em CAN na comparação com JES, pois na primeira foi encontrada a frequência de núcleos na classe 0-15 μm^2 28,07% menor, enquanto nas classes 15-30 μm^2 e 30-45 μm^2 a frequência foi respectivamente 24,79% e 2,7% maior (figura 11).

3.6 Biomarcadores bioquímicos

Poucas variações foram observadas em relação aos biomarcadores bioquímicos no intestino dos bagres das três regiões avaliadas. No caso dos biomarcadores de exposição não foi observado diferenças significativas ($p < 0,05$) na atividade da GST e GSH na comparação das três regiões. Porém, no caso da atividade enzimática da GPx foi observado em CAN o aumento da atividade em 35,89% em relação a JES ($p > 0,05$) (figura 14). Já na comparação JES e SSV, apesar do aumento da atividade da GPx, não ocorreu diferenças significativas ($p > 0,05$), assim como não aconteceu na comparação CAN e SSV ($p > 0,05$) (figura 12).

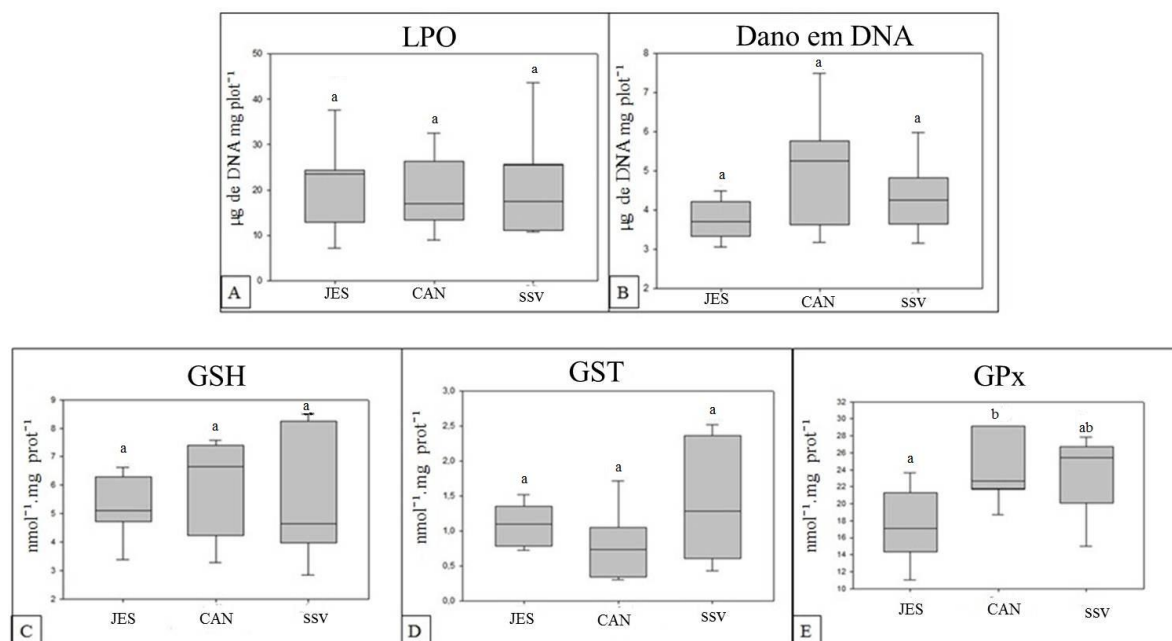


Figura 12. Respostas dos biomarcadores de efeito, LPO (A) e Dano em DNA (B) e de exposição GSH (C), GST (D) e GPx (E) do intestino dos bagres *Genidens barbatus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV). Letras diferentes demonstram diferença significativa pelo teste de One Way ANOVA ($p < 0,05$).

No caso dos biomarcadores de efeito (dano de DNA e LPO), não foi observado variações significativas nas comparações entre os intestinos dos animais das três regiões de estudo (figura 12).

Os resultados do IBR evidenciam, que no intestino dos bagres de JES, como esperado, não ocorreram alterações nas enzimas antioxidantes GPx, GST e GSH. Somado a isso, como já era esperado por JES ser a área referência, observou-se valores de LPO e Danos em DNA relativamente baixos (figura 13).

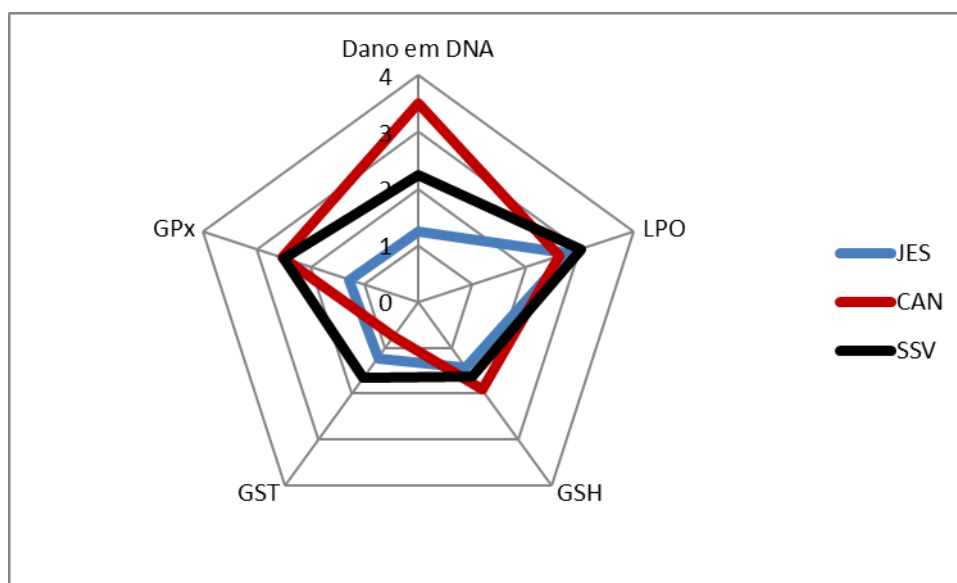


Figura 13. Respostas integradas dos biomarcadores bioquímicos no intestino dos bagres *Genidens barbus* da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Diferente do que foi observado em JES, no caso de CAN o IBR evidenciou alterações nos biomarcadores exposição e efeito. Em relação aos biomarcadores de exposição, percebe-se inibição da GST ao mesmo tempo em que ocorre indução da atividade da GPx e GSH (figura 13). No caso dos biomarcadores de efeito, também é possível perceber aumento nos Danos de DNA no intestino dos bagres de CAN (figura 13). Os valores de LPO foram semelhantes aos encontrados no intestino dos bagres da área referência, indicando ausência de estresse oxidativo pela via estudada.

O IBR também evidenciou a indução da atividade dos biomarcadores de exposição (GPx, GSH e GST) no intestino dos bagres de SSV (figura 13). Além disso, assim como em CAN, ocorreu no intestino dos bagres de SSV a indução de Danos em DNA (figura 13). A atividade da LPO no intestino dos bagres de JES apresentou-se levemente maior que nas duas regiões anteriores.

3.7 Permanova e n-MDS

As análises multivariadas indicam diferença significativa ($p < 0,001$) entre as três regiões de estudo (tabela 7). O gráfico plotado a partir da matriz analisada demonstrou a separação considerável entre as três regiões de estudo (JES, CAN e SSV) (figura 14).

Tabela 7. PERMANOVA calculada a partir dos dados dos biomarcadores bioquímicos e morfológicos, assim como Análise multivariada dos bagres das regiões da Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

Grupos	Teste Pairwise			
	P (perm)		Perms P (MC)	
JES, CAN	2,1499	0,001	934	0,001
JES, SSV	1,8469	0,002	750	0,007
CAN, SSV	2,5659	0,001	920	0,001

Contribuindo para a separação das regiões na análise n-MDS, há diferentes variáveis. Segundo verificado pelo SIMPER, em relação às regiões de JES e CAN, os biomarcadores que mais influenciaram na separação das regiões, foram as análises morfoquantitativas da população neuronal mioentérica geral (Giemsa) a espessura da parede total do intestino e a indução do Dano em DNA e da atividade da GPx. No caso das regiões JES e SSV os biomarcadores, que influenciaram na separação das regiões foram as análises morfométricas de PC e PN da subpopulação metabolicamente ativa; a quantidade de caliciformes PAS⁺; a espessura da camada muscular; o FC e a atividade da GPx. Por fim, no caso das regiões de CAN e SSV os biomarcadores, que influenciaram na separação dessas áreas foram a densidade da população geral de neurônios mioentéricos (Giemsa) e da subpopulação nitrérgica a altura das vilosidades e a espessura da parede total; e a atividade das enzimas GSH e GST.

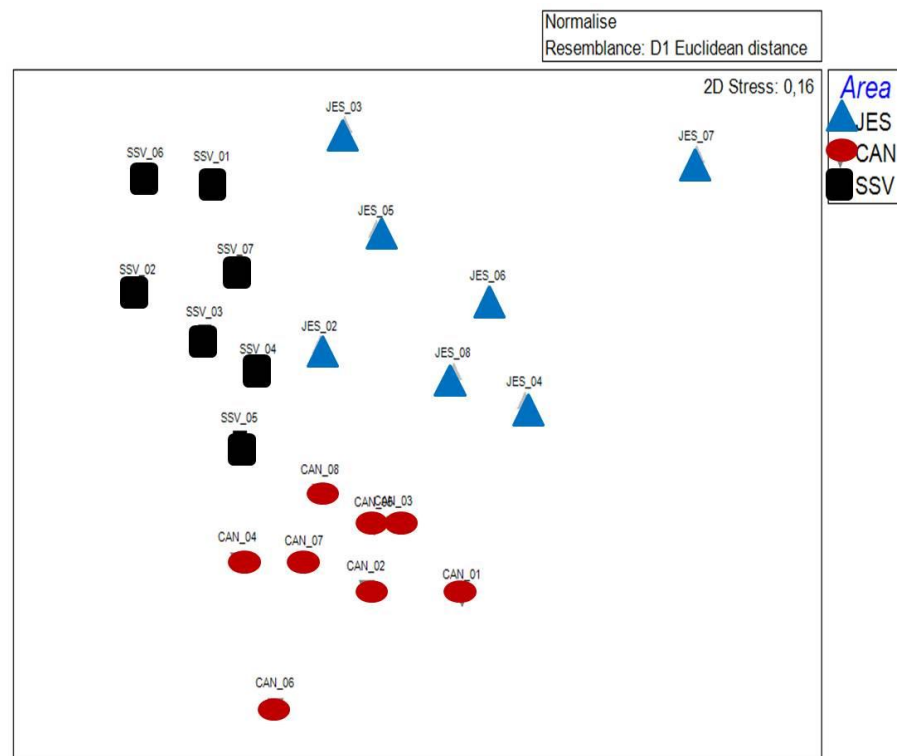


Figura 14. Análise de n-MDS indicando a separação das regiões avaliadas através de análises multivariadas (PERMANOVA). Estação Ecológica Juréia-Itatins (JES), Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) e Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV).

3.8 Análise de Componentes Principais

Dois fatores foram extraídos da matriz original de dados. O fator 1 positivo (F1+) explicou 59,14% da variância e mostrou a associação da indução da atividade da GPx e aumento do LPO. Estes “*factor scores*” foram particularmente relevantes em SSV. No Fator 1 negativo (F1-) os resultados demonstraram a associação da espessura das camadas de submucosa e musculatura; quantidade de caliciformes PAS⁺ e AB⁺; quantidade de IELs; e área dos PC e PN da população geral de neurônios mioentéricos e da subpopulação mioentérica metabolicamente ativa (tabela 8) estas relações apresentaram valores elevados em JES e consequentemente reduzidos em SSV.

Tabela 8. Fatores extraídos nas análises dos bagres *Genidens barbus* do Complexo Estuarino de Santos-São Vicente (SSV) (fator 1) e Sistema Estuarino Lagunar de Cananéia-Iguape-Peruíbe (CAN) (fator 2).

Item analisado	Fator 1	Fator 2
Vilosidade	0,42053	-0,90728
Submucosa	-0,93225	0,36182
Muscular	-0,97371	-0,22779
Parede Total	0,326	-0,945
Densidade subpopulação nitrérgica (NADPH)	0,434	-0,900
Morfometria Perfil Celular (PC)	0,266	0,963
Morfometria Perfil Nuclear (PN)	0,607	0,794
Relação Caliciformes PAS+/E	-0,986	0,165
Relação Caliciformes AB+/E	-0,875	0,482
Relação IELS/E	-0,961	0,273
Fator de Condição	-0,568	0,822
Dano em DNA	0,365	0,930
LPO	0,895	-0,444
GSH	0,107	0,994
GST	0,483	-0,875
GPx	0,850	0,525
Densidade subpopulação NADH-dr	0,467	-0,884
Morfometria Perfil Celular (PC)	-0,995	0,094
Morfometria Perfil Nuclear (PN)	-0,985	-0,169
Densidade população total (GIEMSA)	0,217	0,976
Morfometria Perfil Celular (PC)	-0,812	0,583
Morfometria Perfil Nuclear (PN)	-0,935	-0,352

*Valores em destaque são os que mais contribuíram para a diferença entre as regiões nos fatores 1 e 2. Valores com sinais diferentes (+/-) na mesma coluna demonstram relações antagônicas entre os itens analisados.

O fator 2 positivo (F2+) (principalmente em CAN) explicou 40,85% da variância e mostrou a associação com valores aumentados da área do PC da subpopulação NADPH-dr⁺, a densidade da população geral de neurônios mioentéricos, o FC, a ocorrência de Dano em DNA e a indução da atividade da GSH, esta associação foi relevante em CAN. O fator também demonstrou a associação com valores reduzidos da densidade das subpopulações mioentérica metabolicamente ativa e nitrérgica, altura das vilosidades e espessura da parede total intestinal, e inibição da atividade da GST (tabela 8).

4. DISCUSSÃO

No presente trabalho, os parâmetros físico-químicos apresentaram-se semelhante nas três regiões de coleta, fazendo com que as diferenças encontradas nos biomarcadores avaliados sejam mais relacionadas com a qualidade ambiental destes estuários. Em relação à qualidade da água, as três regiões de estudo apresentaram níveis de OD iguais ou superiores aos estipulados pela CETESB no IQAC (2020) (ideal 6 mg/L). A região de JES apresentou o valor de pH dentro do intervalo estipulado pelo IQAC (pH 6,5 a 8,5), enquanto CAN e SSV apresentaram suas águas levemente mais ácidas

No caso de JES, o fato de os valores dos metais presentes nos valores guia não ultrapassarem os primeiros níveis de contaminação reafirma o grau de proteção existente nessa região. Apesar disso, observou-se concentrações superiores de alguns elementos no sedimento de JES na comparação com as demais regiões como, por exemplo, o arsênio (As). Tal situação é devida as diferentes características e granulometrias dessas regiões estuarinas, uma vez que JES apresentou as maiores quantidades de sedimentos finos, permitindo a maior adsorção de substâncias, como os elementos metálicos (KIM; YANG; KIM, 2020; EKER & ARI, 2020), a presença de sedimentos finos também foi um fator relevante em CAN.

Segundo Choueri et al (2009), que sugere critérios locais para concentrações de metais na região de SSV, esta pode ser classificada como moderadamente poluída por níquel (Ni) e zinco (Zn). Essa classificação é apenas possível, se utilizarmos SQGs específicos para a localidade, que integram e levam em consideração dados físico-químicos, ecotoxicológicos e da estrutura da comunidade bentônica local (CHOUERI et al., 2009). Tais achados são extremamente relevantes, pois são complementares as informações disponíveis na literatura e aumentam as informações sobre a presença de metais na região do Canal de São Vicente, além de destacar a importância da utilização de critérios locais para determinar a contaminação do sedimento nos diferentes pontos.

Porém, esses metais não são os únicos contaminantes, que podem estar influenciando a biota local, uma grande diversidade de contaminantes já foram descritos em diferentes pontos da (ABESSA et al., 2008; CHOUERI et al., 2009). No caso do Canal de São Vicente, há a presença no sedimento de grande contaminação por hidrocarbonetos aromáticos originários de esgoto doméstico não tratado e da drenagem de antigos aterros sanitários (CHOUERI et al., 2009). Também, em diferentes localidades, há a presença de solventes aromáticos,

organoclorados (ABESSA et al., 2008; CHOUERI et al., 2009; PINTO et al., 2015; PERINA et al., 2018), além de contaminantes emergentes (drogas e medicamentos), esses últimos com grandes picos nas épocas de grande concentração de turistas (PEREIRA et al., 2016; PUSCEDDU et al., 2018; CORTEZ et al., 2018; SANTOS et al., 2018

Em SSV, existe a grande disponibilidade de nutrientes e contaminantes influenciadas pelo despejo de efluentes orgânicos e industriais. Nesse sentido, a região de SSV é margeada pela comunidade da "México 70", que apresenta grande população sem acesso a saneamento básico e que despeja constantemente efluentes não tratados no estuário. O despejo desses efluentes pode ser desfavorável ao desenvolvimento da biota (BRAGA et al., 2000; MASUDA; MOSER; BARRERIA, 2011), merecendo destaque para a grande quantidade de contaminantes emergentes, como por exemplo medicamentos, que podem estar sendo despejados nessa região. Porém, em algumas situações os organismos podem se beneficiar do aporte de nutrientes que chega à cadeia trófica, o que explica, por exemplo, peixes com valores elevados de FC em bacias afetadas por esgoto de grandes cidades (ALBERTO et al., 2005).

Em CAN os metais cobre (Cu), chumbo (Pb) e zinco (Zn) ultrapassaram o primeiro nível de contaminação estipulado pelos SQGs brasileiro (CONAMA 454) e canadense (EC, 2007). No caso específico do cobre (Cu), a quantidade descrita aproxima-se muito do nível TEL estipulado pela legislação canadense, onde é provável a ocorrência de algum efeito nocivo sobre a biota. No caso do chumbo (Pb), trabalhos anteriores já haviam alertado sobre concentrações preocupantes desse elemento, inclusive excedendo as concentrações do nível de efeito limiar (PEL), segundo a legislação canadense (TRAMONTE et al., 2016; CRUZ et al., 2019; PERINA & ABESSA, 2020).

Essas concentrações, principalmente de chumbo, são alarmantes uma vez que CAN encontra-se em uma área de proteção, diferente de SSV que é uma área industrial. Sabe-se que quanto mais fino o sedimento maior é a sua superfície e a troca iônica, facilitando a adsorção de metais e de matéria orgânica (KIM; YANG; KIM, 2020; EKER & ARI, 2020). Portanto, como no caso das duas regiões antropizadas, CAN apresentou a maior quantidade de sedimentos finos, fazendo com que o sedimento nessa região possa ser um maior carreador de contaminantes, o que é preocupante quando abordamos organismos que ficam enterrados, tem hábitos demersais ou ingerem o sedimento como, por exemplo, os bagres *G. barbatus*.

Além destes metais dosados no presente estudo, resultados pretéritos também mostraram outros contaminantes em CAN, como por exemplo, organoclorados, fármacos, bisfenilos policlorados, cafeína, fenoprofeno, etc, (MATOS, 2002; SALGADO et al., 2019). Muitos desses contaminantes tem sua presença intensificada no ambiente em épocas de aumento da atividade turística (PERINA & ABESSA, 2020)

Além da exposição aos metais e outros contaminantes por via do sedimento, por serem animais bentofágicos generalistas, os bagres *G.barbus* podem ser expostos a essas substâncias por meio da ingestão de outros organismos com esses materiais bioacumulados ou adsorvidos em seus tecidos. Esses animais alimentam-se pela predação de peixes e invertebrados como camarões *Xiphopenaeus kroyeri* (DI BENEDITTO; TAVARES; MONTEIRO, 2018), que podem bioacumular zinco, cobre e cromo no músculo (NASCIMENTO et al., 2017).

A maior pressão antrópica, juntamente com a presença de contaminantes do ambiente na dieta influencia na qualidade do alimento, acarretando prejuízos ao crescimento dos peixes (ADAMS; RYON, 1994; TOLA et al., 2015). Como os animais das três regiões de coleta estavam no mesmo estágio de maturidade sexual (juvenis), é excluído a possibilidade de que as diferenças corporais encontradas ($p < 0,05$) sejam devidas a fatores hormonais e ao processo de envelhecimento, mas sim a diferenças na qualidade e disponibilidade do alimento pela pressão antrópica.

A condição corpórea dos animais das três regiões foi considerada boa, uma vez que não apresentaram sinais de subnutrição e apresentaram valores elevados de FC (não diferiram significativamente), o que pode ser explicado pela riqueza de nutrientes das regiões estuarinas. De maneira geral, podemos observar que os valores de FC de maneira isolada não refletem o estresse que a contaminação causa nos organismos. E isso é devido ao fato de tal análise ser de natureza mais ecológica e pouco precisa, quando se avalia os efeitos da contaminação ambiental (ADAMS; RYON, 1994), uma vez que diferenças expressivas foram observadas no TGI dos animais das três regiões.

Na comparação entre CAN e JES, a espessura da parede intestinal foi um dos fatores que mais contribuiu para a separação das áreas na análise MDS, e isso foi devido principalmente as menores alturas de vilosidades em CAN. Além dessas menores alturas, a ausência de vilosidades em diferentes quadrantes ao longo do TGI também foi observada. Tais alterações podem ser devidas a prejuízos no processo de *turnover*, com o comprometimento da atividade metabólica relacionada a atividade de proteínas e síntese de

DNA e RNA, resultando na diminuição da renovação celular e na expressão de proteínas. Essa diminuição na renovação celular está relacionada com a aceleração da morte celular, ativada pelas cascatas apoptóticas (BASIVIREDDY et al., 2002; VAN de WALLE et al., 2010; TANG et al., 2014; CHEAT et al., 2015; AWAD; ZENTEK, 2015).

Com base nos resultados do IBR e da PCA, essas alterações ocorreram conjuntamente com a maior ocorrência de dano em DNA, o que pode explicar os prejuízos na atividade metabólica, uma vez que os danos em DNA interferem no ciclo celular, pois as proteínas *chekpoint* o atrasam, fornecendo tempo para os reparos (BASU, 2018). Quando os danos ultrapassam a capacidade do reparo, as vias de morte celular são ativadas, o que desequilibra o processo de renovação do epitélio e culmina no encurtamento das vilosidades.

De acordo com o IBR, o dano em DNA no TGI dos bagres de CAN foi acompanhado de maiores atividades de proteínas do sistema antioxidante (GPx e GSH) e da ausência de peroxidação lipídica, o que demonstra que esses danos não são consequência das respostas oxidativas, ou também que esse estresse oxidativo não está ocorrendo nas membranas. Portanto, as quebras de DNA ocorreram como consequência da ação eletrolítica dos metais no núcleo, pois a interação de cátions metálicos como, por exemplo, cobre e zinco perturbam o processo de transcrição e as propriedades estruturais do DNA (CLEVER; SHIONOYA, 2010; AMRAOUI; MESSAOUDI; HAMMOUTENE, 2020). Alterações na estrutura do DNA pode ocorrer também pela oxidação dos íons metálicos na reação de Fenton produzindo hidroxilas altamente reativas, que não são anuladas de maneira eficiente pelas células eucarióticas (NOBLANC et al., 2013; YOU et al., 2019)

Apesar das perturbações causadas principalmente pelos metais em CAN, não foram encontradas quantidades elevadas de IELs na mucosa intestinal ($p > 0,05$) dos bagres. Tal resultado junto com a ausência de alterações na espessura da submucosa, demonstra a ausência de processos inflamatórios no TGI. A ausência de inflamações deve ser devida a duas causas, a indução na atividade da GPx e GSH e a proteção fornecida pela camada de muco intestinal.

A GPx possui papel fundamental na proteção das membranas contra a peroxidação lipídica, reduzindo os hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados (JABLONSKA et al., 2015), o que explica os baixos valores de LPO no TGI dos bagres de CAN. Esses baixos valores de peroxidação lipídica também são influenciados pela atividade da GSH, que existe em sua forma reduzida e oxidada. Essa enzima, protege as células da apoptose pelos seus

mecanismos multifatoriais, que envolvem desintoxicação e interação com as vias de sinalização, sensíveis ao estado redox (MASELLA et al., 2005). A importância da GSH pode ser observada em trabalhos que relataram a sua diminuição conjuntamente com elevados valores de LPO (NARRA et al., 2017).

A GSH atua de forma conjunta com a GST na eliminação de produtos químicos e espécies reativas de oxigênio (ROS), porém além de atuar como um antioxidante (AHMAD, 2006) tem funções como cofator da GPx e GST (OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). A GST merece destaque, uma vez que de acordo com IBR esteve inibida no TGI dos bagres de CAN, o que deve ser devido ao comportamento em forma de sino dessa enzima (VIEIRA et al., 2009; FONSECA et al., 2011). Esse comportamento já foi descrito em diferentes espécies de peixes, destacando espécies de regiões estuarinas antropizadas (FONSECA et al., 2011), ocorrendo o aumento da atividade enzimática com a exposição aos contaminantes, até um ponto onde posteriormente essa atividade diminui progressivamente (ELIA et al., 2003; FONSECA et al., 2011).

Como comentado anteriormente, a camada de muco intestinal atua nessa defesa contra as ROS geradas pelos contaminantes do meio e isso é demonstrado pela relação antagônica entre os níveis de LPO e a quantidade de células caliciformes PAS⁺ e AB⁺ no TGI dos bagres de CAN evidenciados pela PCA. Como nesses animais as quantidades de células caliciformes foram semelhantes às encontradas em JES, podemos propor que a produção de muco no intestino seja semelhante, fazendo com que a inflamação juntamente com maiores danos na mucosa dos bagres de CAN sejam minimizados pelo muco intestinal produzido pelas células caliciformes, que auxilia na mitigação e proteção contra os efeitos dos contaminantes do meio.

Entretanto, apesar de o muco ter características protetoras sabe-se, que ele facilmente acumula o zinco um dos elementos mais abundantes em CAN e com grande potencial de potencializar a toxicidade. Além disso, a produção em excesso de muco pode causar prejuízos a absorção de nutrientes, ou seja, uma produção de muco semelhante à do intestino dos animais de JES combinada com a baixa superfície de contato da mucosa, pode prejudicar a absorção de nutrientes por esses animais, o que pode se refletir em um déficit nutricional ao longo do desenvolvimento desses juvenis.

No caso do TGI dos bagres de SSV, as maiores alturas das vilosidades merecem destaque, mesmo não sendo encontrado diferença significativa na comparação com a área

referência (JES). Sabe-se, que vilosidades com maiores alturas são consequência de processos mitóticos mais acelerados (SAMANYA; YAMAUCHI et al., 2002) e esse processo é responsável por uma grande proliferação celular, que acarreta fusões nas vilosidades, uma vez que em alguns casos, esse processo resulta na presença de aglomerados celulares nos ápices das vilosidades. Trabalhos futuros devem avaliar também a microbiota intestinal, uma vez que ela pode influenciar em maiores alturas de vilosidades são influenciadas pelos microorganismos intestinais (SAMANYA; YAMAUCHI et al., 2002; GIRGIS et al., 2010).

Assim como em CAN, descartamos o processo inflamatório no TGI dos bagres de SSV, apesar das menores quantidades de caliciformes PAS⁺ e AB⁺ no TGI em comparação com JES e CAN ($p < 0,05$), o que mais uma vez demonstra a influência da dieta contaminada sobre a mucosa desses animais. Em relação a SSV, resultados semelhantes foram observados nessa região, no baiacu *Sphoeroides testudineus*, o que demonstra que em mais de uma espécie a citotoxicidade local vem afetando as células caliciformes e a produção de muco ácido e neutro no TGI (MARINSEK et al., 2018).

Com base nos resultados do IBR e das análises multivariadas, a menor produção de muco no TGI dos bagres de SSV foi acompanhada de maiores valores de peroxidação lipídica (LPO) e indução da atividade da GST e GPx. Tais resultados apontam para o dano oxidativo no intestino desses animais pela exposição aos contaminantes disponíveis. Nesse sentido, apesar da grande diversidade de contaminantes na região, a presença do zinco (Zn) merece destaque, pois apesar de ser um elemento essencial, que atua como cofator de reações enzimáticas e com funções de proteção a apoptose e estresse oxidativo, em altas concentrações é facilmente sequestrado pelo muco intestinal, causando aumento da toxicidade e geração de ROS (WOO et al., 2009; LORO et al., 2012).

As concentrações de níquel (Ni) também podem contribuir para esse processo de dano oxidativo, já que esse elemento pode se acumular-se no intestino e na bile pelo consumo de água. Tal elemento, possui efeito pró-oxidante conhecido, podendo aumentar a produção de ROS e inibir as respostas antioxidantes, suprimindo enzimas e diminuindo a eliminação não enzimática de ROS, criando complexos de níquel com capacidade diminuída de eliminação (Ni-glutationa) (BLEWETT; WOOD, 2014).

Portanto, tais metais assim como outros contaminantes disponíveis no ambiente devem estar produzindo quantidades elevadas de ROS, por meio das vias de NADPH oxidase e reação de Fenton, estimulando a atividade principalmente da GPx, GST e GSH.

No caso da GST a eliminação de compostos reativos ocorre formando conjugados com a glutatona, que são eliminados como ácido mercaptúrico, e o aumento de sua atividade é relacionado a presença de contaminantes orgânicos (AHMAD, 2006), o que faz sentido uma vez que, trabalhos descreveram em pontos da região de SSV a presença de solventes aromáticos, organoclorados e medicamento (ABESSA et al., 2008; CHOUERI et al., 2009; PINTO et al., 2015; PERINA et al., 2018; PUSCEDDU et al., 2018; CORTEZ et al., 2018; SANTOS et al., 2018; CETESB, 2020).

Nesse sentido, merece destaque o fato de GST auxiliar na eliminação de compostos xenobióticos por meio da conjugação com a GSH (RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1991; NARRA et al., 2017), fazendo com que o aumento na atividade da GST registrado em SSV seja atribuído também ao aumento na biotransformação de fase II de metabolização dos xenobióticos. Contudo, apesar de não haver a presença de valores elevados de danos em DNA, os valores elevados de LPO (peroxidação lipídica) demonstram que as defesas antioxidantes não estão conseguindo combater de forma totalmente efetiva as ROS produzidas pela contaminação nos organismos coletados nesta área.

Os resultados da PCA demonstram uma relação antagônica entre a quantidade de caliciformes PAS^+ e AB^+ e os níveis de LPO e GPx. Essa relação é devida ao fato, de que com a menor camada de muco, a mucosa encontra-se mais vulnerável aos efeitos dos contaminantes do meio, o que favorece a peroxidação lipídica induzindo a atividade da GPx como tentativa de combater os peróxidos de hidrogênio e as ROS. A diminuição da camada de muco, principalmente das células PAS^+ , que produzem o muco neutro mais viscoso, permite que a mucosa esteja também vulnerável a auto-digestão pelas enzimas intestinais; ao atrito pela passagem do alimento; favorece o contato de bactérias com o epitélio intestinal e prejudica a nutrição da microbiota (TREVIZAN et al., 2016).

Somado a isso, a diminuição da secreção ácida das caliciformes AB^+ aumenta o tempo de retenção no alimento no intestino (TREVIZAN et al., 2016), o que pode acarretar um maior tempo de exposição da barreira intestinal aos contaminantes, favorecendo a exposição das células da mucosa aos peróxidos de hidrogênio, que causam a peroxidação lipídica.

A rede neuronal mioentérica apresentou a mesma morfologia nos bagres das três áreas de estudo, formando uma rede extremamente difusa e constituída por diferentes cordões nervosos (primário, secundário e terciário) (FURNESS, 2006), com ausência de gânglios e/ou agrupamentos neuronais, diferindo de outras descrições para peixes (BURNSTOCK, 1959;

SOUZA et al., 1982; OLSSON, 2009; MARINSEK et al., 2018; CECCOTTI et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020).

Após a avaliação da rede neuronal, observou-se que a contaminação ambiental nas duas regiões antropizadas, não interferiu na estrutura da rede neuronal. A desestruturação da rede e dos agrupamentos neuronais mioentéricos foi observado em roedores expostos a medicamentos e em peixes em trabalhos de biomonitoramento de áreas antropizadas (KURNIK et al., 2015; MARINSEK et al., 2018; GONÇALVES et al., 2020). Porém, diferenças morfoquantitativas nos neurônios mioentéricos em CAN e SSV, foram observadas.

As diferenças morfoquantitativas são devidas a maiores ou menores valores na quantidade de neurônios, uma vez que não houve interferência de alterações na área intestinal. Portanto, como não ocorreram diferenças em relação a subpopulação nitrérgica, os maiores valores de densidade da população geral em CAN em comparação com JES devem ser devidos a perdas de neurônios colinérgicos e/ou das subpopulações menos abundantes.

Os maiores valores das áreas médias de PC e PN da subpopulação nitrérgica em CAN demonstram o aumento na expressão de NO como forma de proteção contra os contaminantes do meio, o que explica a manutenção da densidade dessa subpopulação em valores semelhantes aos observados em JES. No caso do PN o histograma de frequência deixa claro o predomínio de núcleos com área entre 15-30 μm^2 em CAN, diferindo de JES que não tem essa classe como a mais abundante. Essa situação foi descrita de maneira semelhante em roedores expostos ao pesticida 2,4d, onde os animais apresentaram aumento das áreas neuronais (CORREA et al., 2011; PEREIRA et al., 2013) como consequência do aumento da expressão de NO, que ocorreu como forma de resistência neuronal.

Contudo, o aumento demasiado da expressão de NO pode levar os neurônios mioentéricos a morte, pois em concentrações excessivas como no caso de neuroinflamações, essa molécula inicia o processo de morte pela estimulação das vias de capazes, liberação do glutamato, suspensão da respiração mitocondrial, danos no sistema de reparo, depleção das quantidades de ATP, interrupção do gradiente de ions, ruptura da membrana plasmática, danos no DNA, etc (BAL-PRINCE; BROW, 2001; CONSTESTABILE et al., 2003; GAO et al., 2008). Como não foi observado diminuição da densidade neuronal, os neurônios nitrérgicos dos bagres de CAN devem estar elevando sua atividade e expressão de NO até níveis seguros para a neurodegeneração.

Somado a esse aumento na expressão de NO, os maiores valores de densidade da população geral no plexo mioentérico de CAN poderiam indicar uma tentativa de expulsão dos contaminantes, com especial destaque para os metais através da hiperexpressão da acetilcolina (JONES; BLIKSLAGER, 2002), além da atuação de subpopulações menos abundantes que expressam moléculas com características neuroprotetoras, tais como, polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP), galanina, substância P e peptídeo de transcrição regulado por cocaína e anfetamina (CART) (SOUZA MELO et al., 2017; SZYMANSKA; GONKOWSKI, 2018; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018).

Os resultados morfoquantitativos evidenciam diminuição de neurônios com atividade metabólica ativa do plexo em CAN na comparação com JES. Sabe-se que o chumbo (um dos metais com altas concentrações em CAN) afeta o crescimento axonal e reduz a atividade neuronal (ZHU et al., 2016; GREEN; PLANCHART, 2017). Portanto, com base no seu potencial plástico esses neurônios diminuíram sua atividade metabólica e/ou expressão da proteína NADH-dr, e como consequência sua área de PC, frente a uma situação adversa como a contaminação crônica por metais. Essa menor área do PC no plexo dos animais de CAN foi extremamente expressiva, tendo sido um dos fatores que mais contribuiu para a separação de CAN e JES na análise MDS.

Os resultados da PCA dos animais coletados em CAN demonstram uma relação antagônica entre o dano em DNA e a densidade da subpopulação metabolicamente ativa. A técnica de NADH-dr⁺ evidencia os neurônios com elevada atividade metabólica, incluindo os colinérgicos, que são mais sensíveis aos efeitos da contaminação, e, portanto, os que mais podem estar sendo afetados por esse processo.

Em resumo, menores valores de área de PC foram observados na subpopulação NADH-dr⁺, indicando uma atividade metabólica menor em CAN do que no plexo de JES. Portanto, se sugere que os metais presentes em CAN afetam o metabolismo mitocondrial levando a diminuição da atividade metabólica e prejudicando crescimento neuronal, como foi sugerido em casos com exposição à micotoxina desoxivalenol (RISSATO et al., 2020). Por consequência, a evidênciação de neurônios metabolicamente mais ativos é menor do que no plexo dos bagres de JES. O fato de não haver a classe 90-120µm² e a menor frequência da classe 60-90 µm² em CAN na comparação com JES embasa o argumento da diminuição da área neuronal como consequência da diminuição da atividade metabólica.

Já o plexo dos bagres de SSV não apresentou diferenças na densidade neuronal/mm² e na área média dos PC e PN na subpopulação nitrérgica em relação ao plexo dos animais de JES. Desta forma, podemos afirmar que o ambiente não tem causado estresse elevado aos neurônios mioentéricos nitrérgicos dos bagres de SSV, fazendo com que mantenham sua atividade metabólica e tamanho semelhante aos da área referência.

Todavia, esse resultado não exclui que outras subpopulações estejam afetadas pela dieta contaminada no lúmen intestinal, pois como apresentado anteriormente, a musculatura do TGI desses animais encontra-se atrofiada. Sabe-se que peixes de regiões intensamente antropizadas apresentaram atrofia da musculatura intestinal como uma consequência da perda do equilíbrio entre as duas principais subpopulações neuronais (colinérgica e nitrérgica) (MARINSEK et al., 2018). Os resultados da PCA indicam uma relação antagônica entre a espessura da camada muscular e os níveis de LPO, demonstrando a influência da peroxidação lipídica sobre os neurônios mioentéricos e consequentemente, sobre no tônus muscular do TGI.

Assim como em CAN, em SSV os maiores valores de densidade na população geral podem ser decorrentes da atuação dos neurônios colinérgicos e das subpopulações menos abundantes com características neuroprotetoras. Contudo, devido ao fato de os neurônios colinérgicos serem mais sensíveis aos efeitos da contaminação (MARINSEK et al., 2018) sugerimos que é mais provável que esse aumento, que foi acompanhado da maior densidade da subpopulação metabolicamente ativa seja em consequência da atuação dessas subpopulações neuronais menos abundantes, como já foi demonstrado em trabalhos com fluoreto e bisfenol (SOUZA MELO et al., 2014; SZYMANSKA; GONKOWSKI, 2018; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018).

Tal situação explicaria também a atrofia da musculatura, já que dentro do grupo dessas subpopulações com características neuroprotetoras, há o VIP que possui íntima relação com a subpopulação nitrérgica, atuando também no relaxamento da musculatura (SOUZA MELO et al., 2017; SZYMANSKA; GONKOWSKI, 2018; SZYMANSKA; MAKOWSKA; GONKOWSKI, 2018).

Sendo assim, como no plexo mioentérico de CAN, esses maiores valores de densidade da população geral foram acompanhados da diminuição do metabolismo do plexo mioentérico em SSV. Porém, em SSV a densidade neuronal/mm² da subpopulação metabolicamente ativa foi maior que a observada em JES, fazendo com que esse menor metabolismo do plexo seja

demonstrado pelo predomínio de neurônios com áreas menores, como fica evidente com a hegemonia da classe de $0-30\mu\text{m}^2$ no PC e $0-15\mu\text{m}^2$ no PN em SSV.

O aumento do metabolismo neuronal leva a maior produção de ROS (THRASIVOULOU et al., 2006), que em desequilíbrio com os antioxidantes acarreta no estresse oxidativo, como um efeito secundário da contaminação (HADDAD, 2004; BONGIOVANNI et al., 2007; VENKATARAMAN et al., 2007; BAVITHRA et al., 2013). Portanto, é possível que neurônios das diferentes subpopulações, com maiores áreas, estejam ficando inativos e/ou com baixo metabolismo por perturbações em sua maquinaria causadas pelas ROS, o que permite apenas a marcação de neurônios com menores áreas pela técnica de NADH-dr. Essa inativação neuronal ou redução metabólica pode estar sendo influenciada como estratégia neuroprotetora, por exemplo, contra os elevados valores de Zn e Ni presentes no ponto de coleta em SSV, já que ambos têm atividades pró-oxidantes elevando a concentração ROS (WOO et al., 2009; LORO et al., 2012; BLEWETT, WOOD, 2014).

As alterações morfométricas na subpopulação metabolicamente ativa foram um dos fatores que contribuíram para a separação de SSV e JES na análise MDS. Essa diminuição do metabolismo das diferentes subpopulações neuronais explica a relação antagônica entre as áreas dos PC e PN da subpopulação metabolicamente ativa e os níveis de LPO na análise PERMANOVA. Pois os neurônios mioentéricos como forma de diminuir os efeitos da peroxidação lipídica causada pelo desequilíbrio entre as ROS e as enzimas do sistema antioxidante diminuem seu metabolismo como estratégia protetora.

Observando os resultados morfoquantitativos, percebemos que de maneira geral em CAN e SSV ocorreu a diminuição da atividade metabólica do plexo, porém tal diminuição parece ter sido mais bem compensada em SSV. Essa diferença deve ser devida a interações diferentes dos neurônios mioentéricos com os contaminantes, pois como comentado anteriormente em CAN a ação dos contaminantes se deu por uma via direta com o DNA, enquanto em SSV se deu como consequência do estresse oxidativo causado pelas ROS, que são combatidas pelos neurotransmissores com características neuroprotetoras. Além disso, em CAN e em SSV foi demonstrado a maior resistência da subpopulação nitrérgica frente aos contaminantes disponíveis no meio.

A longo prazo a diminuição no metabolismo pode causar problemas para o funcionamento do TGI, pois sabe-se que conforme os organismos envelhecem o intestino aumenta sua área assim como os neurônios entéricos em um processo natural de hipertrofia.

Porém, o tamanho da área neuronal está ligado a área de inervação dos neurônios entéricos, e como os intestinos dos bagres de CAN, SSV e JES apresentaram áreas semelhantes e os neurônios metabolicamente ativos de CAN e SSV apresentaram áreas de PC menores, por consequência a sua área de inervação também é menor. Essas menores áreas celulares podem dificultar o controle dos alvos de inervação no TGI, principalmente em CAN, que apresentou menor densidade neuronal/mm² nessa subpopulação. Tal situação foi sugerida em roedores que apresentaram menores áreas neuronais após a exposição à micotoxinas (SOUZA et al., 2011).

Além disso, como em ambos os casos a expressão de NO tem se mantido elevada ou semelhante à da área referência, a diminuição da atividade metabólica deve ser predominantemente de neurônios colinérgicos, o que pode desregular o funcionamento do TGI dos bagres das áreas antropizadas, acarretando distúrbios intestinais, que prejudicam a nutrição (SOUZA MELO et al., 2014). Esse processo também pode afetar processos comportamentais básicos, como consequência da íntima relação feita pelo eixo cérebro-intestino-microbiota (BRAAK et al., 2003; DINA; CRYAN, 2013; YOO; MAZMANIAM, 2017; LERNER et al., 2017; ZHU et al., 2017).

5. CONCLUSÃO

As três regiões estuarinas apresentaram diferentes qualidades ambientais, o que se refletiu nas alterações na plasticidade da barreira intestinal. Essa barreira mostrou-se extremamente responsiva aos efeitos da dieta contaminada com os contaminantes presentes no meio em CAN e SSV, com especial foco para a contaminação por metais. As alterações observadas nas duas regiões antropizadas aconteceram, devido a diferentes influências da contaminação ambiental sobre a barreira. Em CAN as alterações observadas ocorreram como consequência da interação dos metais disponíveis no ambiente com o material genético por via direta, o que foi demonstrado pela grande quantidade de Dano em DNA. Já em SSV, as alterações observadas ocorreram como forma de combater o estresse oxidativo gerado pela grande diversidade de contaminantes disponíveis nessa região. Em ambos os casos, a presença das substâncias químicas no ambiente afetou o metabolismo do plexo mioentérico, porém em SSV, tal diminuição foi mais compensada como consequência dessa diferente interação dos neurônios mioentéricos com os contaminantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESSA, D. M., CARR, R. S., RACHID, B. R., SOUSA, E. C., HORTELANI, M. A., SARKIS, J. E. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 50, n. 8, p. 875-885, 2005.

ABESSA, D.M.S CARR, R. S., SOUSA, E. C. P. M., RACHID, B. R. F., ZARONI, L. P., GASPARRO., PINTO, Y.A., BICEGO, M.C., HORTELLANI, M.A., SARKIS, J.E.S., MUNIZ, P. Integrative ecotoxicological assessment of contaminated sediments in a complex tropical estuarine system. *Marine pollution: new research*. p. 125, 2008.

ADAMS, S. M., RYON, M. G. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, v. 3, n. 1, p. 15-25, 1994.

ALBERTO, A., CAMARGO, A. F., VERANI, J. R., COSTA, O. F., FERNANDES, M. N. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 61, n. 2, p. 247-255, 2005.

ANDERSON, M. J.; GORLEY, R. N.; CLARKE, K. R. PERMANOVA for PRIMER: Guide to software and statistical methods. Plymouth, UK: PRIMER-E, 2008.

APPLEGATE, T. J., DIBNER, J. J., KITCHELL, M. L., UNI, Z., LILBURN, M. S. 1999. Effect of turkey (*Meleagris gallopavo*) breeder hen age and egg size on poult development. 2. Intestinal villus growth, enterocyte migration and proliferation of the turkey poult. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 124, n.4, p. 381-389.

ARAÚJO, F. G. Hábitos alimentares de três bagres marinhos (Ariidae) no estuário da Lagoa dos Patos (RS), Brasil. *Atlântica*, v. 7, p.47-63, 1984.

ARTIS, D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews Immunology*, v. 8, n. 6, p. 411, 2008.

ASTM Designation.: E1367 (Reapproved 2014) Standard Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates. This standard is issued under the fixed designation E1367. 2014.

AWAD, W.A. AND ZENTEK, J. The feed contaminant deoxynivalenol affects the intestinal barrier permeability through inhibition of protein synthesis. *Archives of Toxicology*, 89(6), pp.961-965, 2015.

BAL-PRICE, A., BROWN, G. C. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide from activated glia-inhibiting neuronal respiration, causing glutamate release and excitotoxicity. *Journal of Neuroscience*. v. 21, n. 17, p. 6480-6491, 2001.

BANERJEE S, BHATTACHARYA S. Histopathological changes induced by chronic nonlethal levels of elsan, mercury, and ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 31(1), pp.62-68, 1995

Basu, A. K. DNA damage, mutagenesis and cancer. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 4, p. 970, 2018.

BARBIER, E. B., HACKER, S. D., KENNEDY, C., KOCH, E. W., STIER, A. C., & SILLIMAN, B. R. The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecological monographs*, v. 81, n. 2, p. 169-193, 2011.

Barbosa, A.J.F. Técnica histológica para gânglios nervosos intramurais em preparados espessos. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, 11, pp. 95-97. 1979

BASIVIREDDY, J., VASUDEVAN, A., JACOB, M., & BALASUBRAMANIAN, K. A. Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochemical pharmacology*, v. 64, n. 2, p. 339-349, 2002.

BAVITHRA, S., SELVAKUMAR, K., KRISHNAMOORTHY, G., VENKATARAMAN, P., ARUNAKARAN, J. Melatonin attenuates polychlorinated biphenyls induced apoptosis in the neuronal cells of cerebral cortex and cerebellum of adult male rats—in vivo. *Environmental toxicology and pharmacology*, v. 36, n. 1, p. 152-163, 2013.

BELLVER-DOMINGO, Á., FUENTES, R., HERNÁNDEZ-SANCHO, F., CARMONA, E., PICÓ, Y., & HERNÁNDEZ-CHOVER, V. Monetary valuation of salicylic

acid, methylparaben and THCOOH in a Mediterranean coastal wetland through the shadow prices methodology. *Science of the Total Environment*. v. 627, p. 869-879, 2018.

BIANCHI, T.S. Biogeoquímica de estuários. Oxford University Press on Demand, 2007.

BISCHOFF, S. C., BARBARA, G., BUURMAN, W., OCKHUIZEN, T., SCHULZKE, J. D., SERINO, M., WELLS, J. M. Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, v. 14, n. 1, p. 189, 2014.

BLEWETT, T. A., & WOOD, C. M. Salinity-dependent nickel accumulation and oxidative stress responses in the euryhaline killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, v. 68, n. 2, p. 382-394, 2015.

BRAGA, E. S., BONETTI, C. V., BURONE, L., & BONETTI FILHO, J. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System—Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 40, n. 2, p. 165-173, 2000.

BRAAK, H., RÜB, U., GAI, W. P., DEL TREDICI, K. Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of neural transmission*, v. 110, n. 5, p. 517-536, 2003.

BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 254:248–254, 1976.

BONGIOVANNI, B., DE LORENZI, P., FERRI, A., KONJUH, C., RASSETTO, M., DE DUFFARD, A. E., DUFFARD, R. (2007). Melatonin decreases the oxidative stress produced by 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid in rat cerebellar granule cells. *Neurotoxicity research*, v. 11, n. 2, p. 93, 2007.

BURNSTOCK, G. The innervation of the gut of the brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Cell Science*, v. 3, n. 50, p. 199-220, 1959.

CAHOON, L. B., HALES, J. C., CAREY, E. S., LOUCAIDES, S., ROWLAND, K. R., TOOTHMAN, B. R. Multiple modes of water quality impairment by fecal contamination in a rapidly developing coastal area: southwest Brunswick County, North Carolina. *Environmental monitoring and assessment*, s.l, v.188, n.2, p.89, 2016.

CAMARA-LEMARROY, C. R., METZ, L., MEDDINGS, J. B., SHARKEY, K. A., WEE YONG, V. The intestinal barrier in multiple sclerosis: implications for pathophysiology and therapeutics. *Brain*, v. 141, n. 7, p. 1900-1916, 2018.

CECCOTTI, C., GIARONI, C., BISTOLETTI, M., VIOLA, M., CREMA, F., TEROVA, G. Neurochemical characterization of myenteric neurons in the juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata*) intestine. *PloS one*, v. 13, n. 8, p. e0201760, 2018

CHEAT, S., GEREZ, J.R., COGNIÉ, J., ALASSANE-KPEMBI, I., BRACARENSE, A.P.F., RAYMOND-LETRON, I., OSWALD, I.P. AND KOLF-CLAUW, M. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa in vitro on explants and in vivo on intestinal loops. *Toxins*, 7(6), pp.1945-1961, 2015

CHEROUTRE, H., LAMBOLEZ, F. AND MUCIDA, D. The light and dark sides of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 11(7), pp.445-456, 2011

CHIU, C. Y., CHIU, H. C., LIU, S. H., & LAN, K. C. Prenatal developmental toxicity study of strontium citrate in Sprague Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 101, p. 196-200, 2019.

CHOUERI, R. B.; CESAR, A. ; ABESSA, D. M. S. ; TORRES, R. J. ; Morais, R. D. ; RIBA, I. ; PEREIRA, C. D. S. ; NASCIMENTO, M. ; MOZETO, A. A. ; DEL VALLS, A. T. . Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *Journal of Hazardous Materials (Print)*, v. 170, p. 320-331, 2009.

CONTESTABILE, A., MONTI, B., CONTESTABILE, A., CIANI, E. Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. *Current medicinal chemistry*, v. 10, n. 20, p. 2147-2174, 2003.

CORREA, O. P., MARI, R. B., TOLEDO, E. L., GUIMARÃES, J. P., PEREIRA, J. N. B., GERMANO, R. M., FARIA, H.G., SOUZA, R.R., STABILLE, S. R. (2011). Effects of the ingestion of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid on jejunal myenteric neurons in rats. *J Morphol Sci.* v. 28, p. 104-112, 2011.

CORTEZ, F. S., DA SILVA SOUZA, L., GUIMARÃES, L. L., ALMEIDA, J. E., PUSCEDDU, F. H., MARANHO, L. A., MOTA, L.G., NOBRE, C.R., MORENO, B.B., ABESSA, D.M.S., CESAR, A., SANTOS, A.R., PEREIRA, C.D.S Ecotoxicological effects of losartan on the brown mussel *Perna perna* and its occurrence in seawater from Santos Bay (Brazil). *Science of the Total Environment*, v. 637, p. 1363-1371, 2018.

CRUZ, A. C. F., DAVANSO, M. B., ARAUJO, G. S., BURUAEM, L. M., SANTAELLA, S. T., DE MORAIS, R. D., ABESSA, D. M. Cumulative influences of a small city and former mining activities on the sediment quality of a subtropical estuarine protected area. *Environmental monitoring and assessment*, s.l, v.186, n.11, p.7035-7046, 2014.

CRUZ, A. C. F.; GUSSO-CHOUERI, PALOMA ; ARAUJO, GIULIANA SERAPHIM DE ; CAMPOS, BRUNO GALVÃO ; ABESSA, D. M. S. . Levels of metals and toxicity in sediments from a Ramsar site influenced by former mining activities. *ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY*, v. 171, p. 162-172, 2019.

CUI, L., LI, L., ZHANG, A., PAN, G., BAO, D., CHANG, A. Biochar amendment greatly reduces rice Cd uptake in a contaminated paddy soil: a two-year field experiment. *Bio Resources*, s.l, v.6, n.3, p.2605-2618, 2011.

da SILVA BANCÍ, K. R., MORI, G. M., DE OLIVEIRA, M. A., PAGANELLI, F. L., PEREIRA, M. R., & PINHEIRO, M. A. A. Can environmental pollution by metals change genetic diversity? *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) as a study case in Southeastern Brazilian mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, v. 116, n. 1-2, p. 440-447, 2017.

de ALMEIDA DUARTE, L. F., DE SOUZA, C. A., PEREIRA, C. D. S., PINHEIRO, M. A. A. Metal toxicity assessment by sentinel species of mangroves: In situ case study integrating chemical and biomarkers analyses. *Ecotoxicology and environmental safety*, v. 145, p. 367-376, 2017.

de MIRANDA, L. B. Princípios de Oceanografia Física de Estuários Vol. 42. Edusp, 2002.

de SOUZA, H. S., FIOCCHI, C., ILIOPOULOS, D. The IBD interactome: an integrated view of aetiology, pathogenesis and therapy. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 14, n. 12, p. 739, 2017.

De Souza, R. R., Ferri, S., Ferraz de Carvalho, C. A., & Paranhos, G. S. Myenteric plexus in a freshwater teleost intestine. I. Quantitative study of nerve cells. *Anatomischer Anzeiger*, v. 152, n. 4, p. 359-362, 1982.

DELGADO, M. E., GRABINGER, T., BRUNNER, T. Cell death at the intestinal epithelial front line. *The FEBS journal*, v. 283, n. 14, p. 2701-2719, 2016.

DENADAI, M. R., BESSA, E., SANTOS, F. B., FERNANDEZ, W. S., SANTOS, F. M. D. C., FEIJÓ, M.M., ARCURI, C.D., TURRA, A. Life history of three catfish species (Siluriformes: Ariidae) from southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, v. 12, n. 4, p. 74-83, 2012.

DIAMANTE, N. A., RIBEIRO, A. A., TIBÚRCIO, V. G., DA SILVA ROVIDA, A. F., DE BRITTO MARI, R., STABILLE, S. R., DE MELO GERMANO, R. Investigação dos efeitos do ácido 2, 4 diclorofenoxiacético sobre diferentes populações de neurônios mioentéricos do duodeno de ratos. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. v. 17, n. 2, 2014.

DIAS, M.L. Macrofauna bentônica e ecotoxicidade de sedimentos como indicadores de qualidade ambiental em estuários da região do mosaico de unidades de conservação da jureia-itatins e entorno (sp, Brasil), Universidade Santa Cecília, 2015.

DINAN, T. G., CRYAN, J. F. Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology & Motility*, v. 25, n. 9, p. 713-719, 2013.

Environment Canada and Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2007,. Criteria for the Assessment of Sediment Quality in Quebec and Application Frameworks: Prevention, Dredging and Remediation.

ELIA, A. C., GALARINI, R., TATICCHI, M. I., DÖRR, A. J. M., & MANTILACCI, L. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, n. 2, p. 162-167, 2003.

ELLIOTT, M; WHITFIELD, A.K. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, s.l, v. 94, n. 4, p. 306-314, 2011.

EKER, Ç. S., & ARI, U. V. Comparison of sandstone and mudstone with different methods for assessing toxic element contamination in the Early–Middle Jurassic sediments of Gümüşhane (NE Turkey). *Environmental Earth Sciences*, v. 79, n. 19, p. 1-15, 2020.

FIGUEIREDO, J. L., & MENEZES, N. A. Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil, II-Teleostei (1) Museu de Zoologia. Universidade de São Paulo, 110p, 1978.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system. Blackwell Publishing, 2006.

FURNESS, J. B. The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, v. 9, n. 5, p. 286, 2012.

GABELLA, G. Detection of nerve cells by a histochemical technique. *Experientia*, v. 25, n. 2, p. 218-219, 1969.

GAGNÉ, F., BLASÉ, C. Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environmental Toxicology Water Qual.* 10,217–229, 1995.

GAO, H. M., KOTZBAUER, P. T., URYU, K., LEIGHT, S., TROJANOWSKI, J. Q., LEE, V. M. Y. Neuroinflammation and oxidation/nitration of α -synuclein linked to dopaminergic neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*. v. 28, n. 30, p. 7687-7698, 2008.

GERSHON, M. D., CHALAZONITIS, A., ROTHMAN, T. P. From neural crest to bowel: development of the enteric nervous system. *Journal of neurobiology*, s.l v.24, n.2, p.199-214,1993.

GIRGIS, G. N., BARTA, J. R., BRASH, M., & SMITH, T. K. Morphologic changes in the intestine of broiler breeder pullets fed diets naturally contaminated with Fusarium mycotoxins with or without coccidial challenge. *Avian diseases*, v. 54, n. 1, p. 67-73, 2010.

GREEN, A. J., & PLANCHART, A The neurological toxicity of heavy metals: A fish perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 208, p. 12-19, 2018.

GONÇALVES, A. R. N., MARINSEK, G. P., DE SOUZA ABESSA, D. M., DE BRITTO MARI, R. Adaptative responses of myenteric neurons of *Sphoeroides testudineus* to environmental pollution. *NeuroToxicology*. V.76, p.84-92, 2020.

GONKOWSKI, S; GAJECKA, M; MAKOWSKA, K. Mycotoxins and the enteric nervous system. *Toxins*, v. 12, n. 7, p. 461, 2020.

GRIBOFF, J., HORACEK, M., WUNDERLIN, D. A., MONFERRAN, M. V. Bioaccumulation and trophic transfer of metals, As and Se through a freshwater food web affected by anthropic pollution in Córdoba, Argentina. *Ecotoxicology and environmental safety*, s.l, v.148, p. 275-284, 2018.

HADDAD, J. J. Redox and oxidant-mediated regulation of apoptosis signaling pathways: immuno-pharmaco-redox conception of oxidative siege versus cell death commitment. *International Immunopharmacology*, v. 4, n. 4, p. 475-493, 2004.

HAYDAY, A., THEODORIDIS, E., RAMSBURG, E. and Shires, J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature immunology*, 2(11), pp.997-1003, 2001

HIROTA, J., & SZYPER, J. P. Separation of total particulate carbon into inorganic and organic components 1. *Limnology and Oceanography*, v. 20, n. 5, p. 896-900, 1975.

HORTELLANI, M. A., SARKIS, J. E., ABESSA, D. M. D. S., SOUSA, E. C. Avaliação da contaminação por elementos metálicos dos sedimentos do Estuário Santos-São Vicente. *Química Nova*, p. 10-19, 2008.

HUANG, C., WU, P., JIANG, W. D., LIU, Y., ZENG, Y. Y., JIANG, J., KUANG, S.Y., TANG, L., ZHANG,Y.U., ZHOU, X.Q., FENG, L. Deoxynivalenol decreased the growth performance and impaired intestinal physical barrier in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish & shellfish immunology*, s.l, v. 80, p. 376-391, 2018.

JABLONSKA, E., GROMADZINSKA, J., PEPLONSKA, B., FENDLER, W., RESZKA, E., KROL, M. B., ... & WASOWICZ, W. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase activity relationship in breast cancer depends on functional polymorphism of GPX1. *BMC cancer*, v. 15, n. 1, p. 1-12, 2015.

JAHAN, S., STREZOV, V. Assessment of trace elements pollution in the sea ports of New South Wales (NSW), Australia using oysters as bioindicators. *Scientific reports*, s.l, v. 9, n.1, p.1416, 2019.

KEEN, J.H., et al., Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. *Journal of Biology and Chemistry* 251:6183–6188, 1976

KIM, S., YANG, D. S., & KIM, Y. S. Distribution of metal contamination and grain size in the sediments of Nakdong River, Korea. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 192, n. 8, p. 1-15, 2020.

KURNIK, M., GIL, K., GAJDA, M., THOR, P., BUGAJSKI, A. Neuropathic alterations of the myenteric plexus neurons following subacute intraperitoneal administration of salsolinol. *Folia histochemica et cytobiologica*, v. 53, n. 1, p. 49-61, 2015.

LAMPARELLI, M. C., COSTA, M. P. D., PRÓSPERI, V. A., BEVILACQUA, J. E., ARAÚJO, R. P. D. A., EYSINK, G. G. J., POMPEIA, S. Sistema Estuarino de Santos e São Vicente. In *Sistema estuarino de Santos e São Vicente*. p. 142-142, 2001.

LE CREN, E. D. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). *The Journal of Animal Ecology*, p. 201-219, 1951

LERNER, A., NEIDHÖFER, S., MATTHIAS, T. The gut microbiome feelings of the brain: a perspective for non-microbiologists. *Microorganisms*, v. 5, n. 4, p. 66, 2017.

LIÉVIN-LE MOAL, V. AND SERVIN, A.L., 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical microbiology reviews*, v. 19, n.2, pp.315-337, 2006

LIU, C., CHANG, V. W., & GIN, K. Y. Environmental toxicity of PFCs: An enhanced integrated biomarker assessment and structure–activity analysis. *Environmental toxicology and chemistry*, v. 32, n. 10, p. 2226-2233, 2013.

LIU, Z., CHEN, B., LI, X., WANG, L. A., XIAO, H., & LIU, D. Toxicity assessment of artificially added zinc, selenium, and strontium in water. *Science of the total environment*, v. 670, p. 433-438, 2019.

LORO, V. L., JORGE, M. B., DA SILVA, K. R., & WOOD, C. M. Oxidative stress parameters and antioxidant response to sublethal waterborne zinc in a euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*: protective effects of salinity. *Aquatic Toxicology*, v. 110, p. 187-193, 2012.

MAHIQUES, M. M. D., BURONE, L., FIGUEIRA, R. C. L., LAVENÉRE-WANDERLEY, A. A. D. O., CAPELLARI, B., ROGACHESKI, C. E., BARROSO, C.P., DOS SANTOS, L.A.S., CORDEIRO, L.M., & Cussioli, M. C. Anthropogenic influences in a lagoonal environment: a multiproxy approach at the Valo Grande mouth, Cananéia-Iguape system (SE Brazil). *Brazilian Journal of Oceanography*, v. 57, n. 4, p. 325-337, 2009.

MCCAIVE, I. N., & SYVITSKI, J. P. Principles and methods of geological particle size analysis. Principles, methods and application of particle size analysis, p. 3-21, 1991.

MARINSEK, G. P., DE SOUZA ABESSA, D. M., GUSSO-CHOUERI, P. K., CHOUERI, R. B., GONÇALVES, A. R. N., BARROSO, B. V. D. A., SPUZA, G.G., CESTARI, M.M., CAMPOS, B.G., DE BRITTO MARI, R. Enteric nervous system analyses: New biomarkers for environmental quality assessment. *Marine Pollution Bulletin*, v. 137, p. 711-722, 2018.

MARTINI, E., KRUG, S. M., SIEGMUND, B., NEURATH, M. F., BECKER, C. Mend your fences: the epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease. *Cellular and molecular gastroenterology and hepatology*. v. 4, n. 1, p. 33-46, 2017.

MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., VARÌ, R., FILESÌ, C., & GIOVANNINI, C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 16, n. 10, p. 577-586, 2005.

MASSEY, V.L ARTEEL. G.E Acute alcohol-induced liver injury. *Frontiers in physiology*, v. 3, p. 193, 2012.

MATOS, M. A. C. Resíduos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em sedimentos e algas de Santos e Cananéia, SP, Brasil (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo), 2002.

MASUDA, L. S. M., MOSER, G. A. O., & BARRERA-ALBA, J. J. VARIAÇÃO temporal do fitoplâncton no canal estuarino de Santos (sp). *Braz. J. Aquat. Sci. Technol*, v. 15, n. 1, p. 79-93, 2011

MENDOZA-CARRANZA, M., VIEIRA, J. P. Ontogenetic niche feeding partitioning in juvenile of white sea catfish *Genidens barbus* in estuarine environments, southern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, v. 89, n. 4, p. 839-848, 2009.

MISHIMA, M., TANJI, S. Nicho alimentar de bagres marinhos (Teleostei, Ariidae) no complexo estuarino lagunar de Cananéia (25°S, 48°W). *Bol. Inst. Pesca*, v. 9, p. 131-140, 1982.

NARRA, M. R., RAJENDER, K., REDDY, R. R., MURTY, U. S., & BEGUM, G. Insecticides induced stress response and recuperation in fish: biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. *Chemosphere*, v. 168, p. 350-357, 2017.

NASCIMENTO, J. R., SABADINI-SANTOS, E., CARVALHO, C., KEUNECKE, K. A., CÉSAR, R., & BIDONE, E. D. Bioaccumulation of heavy metals by shrimp (*Litopenaeus schmitti*): A dose-response approach for coastal resources management. *Marine pollution bulletin*, v. 114, n. 2, p. 1007-1013, 2017.

NOBLANC, A., KOCER, A., CHABORY, E., VERNET, P., SAEZ, F., CADET, R., CONRAD, M. & DREVET, J. Glutathione peroxidases at work on epididymal spermatozoa: an example of the dual effect of reactive oxygen species on mammalian male fertilizing ability. *Journal of andrology*, v. 32, n. 6, p. 641-650, 2011.

ODENWALD, M. A., TURNER, J. R. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target? *Nature reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 14, n. 1, p. 9, 2017.

OLSSON, C. Autonomic innervation of the fish gut. *Acta Histochemical*. v. 111, n. 3, p. 185-195, 2009.

OSBORNE OJ, LIN S, CHANG CH, JI Z, YU X, WANG X, LIN S, XIA T, NEL AE. Organ-specific and size-dependent Ag nanoparticle toxicity in gills and intestines of adult zebrafish. *ACS nano*, 9(10), pp.9573-9584, 2015.

OOST, R. V., BEYER, J., VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

PENDYALA, S., WALKER, J. M., HOLT, P. R. A high-fat diet is associated with endotoxemia that originates from the gut. *Gastroenterology*, v. 142, n. 5, p. 1100-1101. e2, 2012.

PEREIRA, J., SCOZ-FAGLIONI, J. R., GERMANO, R. M., STABILLE, S. R., MARI, R. B. Alterations in the duodenum myenteric neurons of Wistar rats after ingesting of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid. *Journal of Morphological Sciences*. P.28-32, 2013.

PEREIRA, C. D. S., MARANHO, L. A., CORTEZ, F. S., PUSCEDDU, F. H., SANTOS, A. R., RIBEIRO, D. A., CESA, A., GUIMARÃES, L. L. Occurrence of pharmaceuticals and cocaine in a Brazilian coastal zone. *Science of the Total Environment*. v. 548, p. 148-154, 2016.

PEREIRA, P., PUGA, S., CARDOSO, V., PINTO-RIBEIRO, F., RAIMUNDO, J., BARATA, M., POUSÃO-FARREIRA, P., PACHECO, M., ALMEIDA, A. Inorganic mercury accumulation in brain following waterborne exposure elicits a deficit on the number of brain cells and impairs swimming behavior in fish (white seabream—*Diplodus sargus*). *Aquatic Toxicology*. v. 170, p. 400-412, 2016.

PERINA, F. C., & ABESSA, D. M. D. S. Contamination and toxicity in a subtropical Estuarine Protected Area influenced by former mining activities. *Ocean and Coastal Research*, v. 68, 2020.

PERINA, F. C., TORRES, R. J., MOZETO, A. A., NASCIMENTO, M. R. L., DE SOUZA ABESSA, D. M. Sediment quality assessment of the tributaries of the Santos-São Vicente Estuarine System–Brazil. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. v. 13, n. 2, p. 25-38, 2018.

PINTO, A. B., PAGNOCCA, F. C., PINHEIRO, M. A. A., FONTES, R. F. C., DE OLIVEIRA, A. J. F. C. Heavy metals and TPH effects on microbial abundance and diversity in two estuarine areas of the southern-central coast of São Paulo State, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 96, n. 1-2, p. 410-417, 2015.

PINHEIRO, M. A. A., DUARTE, L. F. A., TOLEDO, T. R., ADAM, M. L., TORRES, R. A. Habitat monitoring and genotoxicity in *Ucides cordatus* (Crustacea:

Ucididae), as tools to manage a mangrove reserve in southeastern Brazil. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 185, n. 10, p. 8273-8285, 2013.

PUSCEDDU, F. H., CHOUERI, R. B., PEREIRA, C. D. S., CORTEZ, F. S., SANTOS, D. R. A., MORENO, B. B., SANTO, A.R., ROGERO, J.R., CESAR, A. Environmental risk assessment of triclosan and ibuprofen in marine sediments using individual and sub-individual endpoints. *Environmental Pollution*, v. 232, p. 274-283, 2018.

RISSATO, D. F., DE SANTI RAMPAZZO, A. P., BORGES, S. C., SOUSA, F. C., BUSSO, C., BUTTOW, N. C., & NATALI, M. R. M. Chronic ingestion of deoxynivalenol-contaminated diet dose-dependently decreases the area of myenteric neurons and gliocytes of rats. *Neurogastroenterology & Motility*, v. 32, n. 4, p. e13770, 2020.

RODRIGUEZ-ARIZA, A., PEINADO, J., PUEYO, C., & LOPEZ-BAREA, J. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, v. 50, n. 12, p. 2568-2573, 1993.

SALGADO, L.D., MARQUES, A.E.M.L., KRAMER, R.D., DE OLIVEIRA, F.G., MORETTO, S.L., DE LIMA, B.A., PRODOCIMO, M.M., CESTARI, M.M., DE AZEVEDO, J.C.R. & DE ASSIS, H.C.S. "Integrated assessment of sediment contaminant levels and biological responses in sentinel fish species *Atherinella brasiliensis* from a sub-tropical estuary in south Atlantic." *Chemosphere* 219 (2019): 15-27.

SALVO ROMERO, E., ALONSO COTONER, C., PARDO CAMACHO, C., CASADO BEDMAR, M., VICARIO, M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, v. 107, n. 11, p. 686-96, 2015.

SAMANYA, M., & YAMAUCHI, K. E. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis* var. natto. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 133, n. 1, p. 95-104, 2002.

SANTOS, D. M., BURUAEM, L., GONÇALVES, R. M., WILLIAMS, M., ABESSA, D. M., KOOKANA, R., DE MARCHI, M. R. R. Multiresidue determination and predicted risk assessment of contaminants of emerging concern in marine sediments from the vicinities of submarine sewage outfalls. *Marine Pollution Bulletin*, v. 129, n. 1, p. 299-307, 2018.

SCHERER-SINGLER, U., VINCENT, S. R., KIMURA, H., MCGEER, E. G. Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *Journal of neuroscience methods*, v. 9, n. 3, p. 229-234, 1983.

SEDLAK, J., LINDSAY, R., Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25:192–205, 1968.

SIES, H., KOCH, O.R., MARTINO, E., BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. *FEB., Lett.*, 103, 287–290, 1979

SOUSA, F. C., SCHAMBER, C. R., AMORIN, S. S. S., NATALI, M. R. M. Effect of fumonisin-containing diet on the myenteric plexus of the jejunum in rats. *Autonomic Neuroscience*, v. 185, p. 93-99, 2011.

SOUZA MELO, C. G., PERLES, J. V. C. M., ZANONI, J. N., DE SOUZA, S. R. G., SANTOS, E. X., DE LIMA LEITE, A., HEUBEL, A.D., SOUZA, C.O., SOUZA, J. G., BUZALAF, M. A. R. Enteric innervation combined with proteomics for the evaluation of the effects of chronic fluoride exposure on the duodenum of rats. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1070, 2017.

SZYMANSKA, K.; GONKOWSKI, S. Bisphenol A—Induced changes in the enteric nervous system of the porcine duodenum. *Neurotoxicology*. v. 66, p. 78-86, 2018.

SZYMANSKA, K., MAKOWSKA, K., GONKOWSKI, S. The influence of high and low doses of bisphenol a (BPA) on the enteric nervous system of the porcine ileum. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 3, p. 917, 2018.

UNEP [United Nations Environment Programme]. *Marine and coastal ecosystems and human wellbeing: A synthesis report based on the findings of the Millennium Ecosystem Assessment*. UNEP, Nairobi, Kenya, 2006.

UNESCO. Biosphere Reserve Information, 1992.

<http://www.unesco.org/mabdb/br/brdir/directory/biores.asp?code=bra+01&mode=all>
(Accessed in 01/11/2019).

UNI, Z., GEYRA, A., BEN-HUR, H., SKLAN, D. Small intestinal development in the young chick: crypt formation and enterocyte proliferation and migration. *British poultry science*, 41(5), 544-551, 2000

USEPA. Method 3510C: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. 8p, 1996.

VENKATARAMAN, P., MUTHUVEL, R., KRISHNAMOORTHY, G., ARUNKUMAR, A., SRIDHAR, M., SRINIVASAN, N., BALASUBRAMANIAN, K., ARULDHAS, M.M., ARUNAKARAN, J. PCB (Aroclor 1254) enhances oxidative damage in rat brain regions: protective role of ascorbic acid. *Neurotoxicology*, v. 28, n. 3, p. 490-498, 2007.

VIEIRA, K. S., NETO, J. A. B., CRAPEZ, M. A. C., GAYLARDE, C., DA SILVA PIERRI, B., SALDAÑA-SERRANO, M., BAINY, A.C.D., NOGUEIRA, D.J & FONSECA, E. M. Occurrence of microplastics and heavy metals accumulation in native oysters *Crassostrea Gasar* in the Paranaguá estuarine system, Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, v. 166, p. 112225, 2021.

TANG, B., LI, Q., ZHAO, X. H., WANG, H. G., LI, N., FANG, Y., ... & MAO, X. H. Shiga toxins induce autophagic cell death in intestinal epithelial cells via the endoplasmic reticulum stress pathway. *Autophagy*, v. 11, n. 2, p. 344-354, 2015.

THRASIVOULOU, C., SOUBEYRE, V., RIDHA, H., GIULIANI, D., GIARONI, C., MICHAEL, G. J., COWEN, T. Reactive oxygen species, dietary restriction and neurotrophic factors in age-related loss of myenteric neurons. *Aging Cell*, v. 5, n. 3, p. 247-257, 2006.

TOLA, S., BUREAU, D., HOOFT, J., BEAMISH, F., SULYOK, M., KRSKA, R., ... & PETKAM, R. Effects of wheat naturally contaminated with fusarium mycotoxins on growth performance and selected health indices of red tilapia (*O. niloticus* × *O. mossambicus*). *Toxins*. v. 7, n. 6, p. 1929-1944, 2015.

TORO, P. P. V., BEDOYA, L. F. V., CORREA, I. D., FRANCO, G. R. B., ALCANTARA-CARRIO, J., BAENA, J. A. P. Impact of terrestrial mining and intensive agriculture in pollution of estuarine surface sediments: Spatial distribution of trace metals in the Gulf of Urabá, Colombia. *Marine Pollution Bulletin*, s.l, v. 111, n.1-2, p. 311-320, 2016.

TRAMONTE, K. M., FIGUEIRA, R. C. L., DE LIMA FERREIRA, P. A., RIBEIRO, A. P., BATISTA, M. F., DE MAHIQUES, M. M. Environmental availability of potentially toxic elements in estuarine sediments of the Cananéia-Iguape coastal system, Southeastern Brazil. *Marine Pollution Bulletin*, s.l, v. 103, n.1-2, p.260-269, 2016.

TREVIZAN, A.R., VICENTINO-VIEIRA, S.L., DA SILVA WATANABE, P., GÓIS, M.B., DE MELO, G.D.A.N., GARCIA, J.L., DE ALMEIDA ARAUJO, E.J. AND SANT'ANA, D.D.M.G. Kinetics of acute infection with *Toxoplasma gondii* and histopathological changes in the duodenum of rats. *Experimental parasitology*, 165, pp.22-29. 2016

TUNDISI, J. G., & TUNDISI, T. M Impactos potenciais das alterações do Código Florestal nos recursos hídricos. *Biota Neotropica*, v. 10, n. 4, p. 67-75, 2010.

TURNER, J. R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, v. 9, n. 11, p. 799, 2009.

VANDERMARKEN, T., GAO, Y., BAEYENS, W., DENISON, M. S., CROES, K. Dioxins, furans and dioxin-like PCBs in sediment samples and suspended particulate matter from the Scheldt estuary and the North Sea Coast: Comparison of CALUX concentration levels in historical and recent samples. *Science of the Total Environment*, v. 626, p. 109-116, 2018.

VAN DE WALLE, J., HENDRICKX, A., ROMIER, B., LARONDELLE, Y., & SCHNEIDER, Y. J. Inflammatory parameters in Caco-2 cells: effect of stimuli nature, concentration, combination and cell differentiation. *Toxicology in Vitro*, v. 24, n. 5, p. 1441-1449, 2010.

VIEIRA, L. R., GRAVATO, C., SOARES, A. M. V. M., MORGADO, F., & GUILHERMINO, L. Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, v. 76, n. 10, p. 1416-1427, 2009.

WILLS, E. D. Evaluation of lipid peroxidation in lipids and biological membranes. *Biochemical toxicology: a practical approach*, 1987.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



YOO, B. B., MAZMANIAN, S. K. The enteric network: interactions between the immune and nervous systems of the gut. *Immunity*, v. 46, n. 6, p. 910-926, 2017.

YOU, C., GAO, Z., WU, H., SUN, K., NING, L., LIN, F., SUN, B & WANG, F. Reactive oxygen species mediated theranostics using a Fenton reaction activable lipopolymerosome. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 7, n. 2, p. 314-323, 2019.

ZHU, B., WANG, Q., SHI, X., GUO, Y., XU, T., & ZHOU, B. Effect of combined exposure to lead and decabromodiphenyl ether on neurodevelopment of zebrafish larvae. *Chemosphere*, v. 144, p. 1646-1654, 2016.