
Ciências Biológicas

LUÁ TAIBO TIMPONE

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE TECIDO
ADIPOSO DE *PROCHILODUS LINEATUS*
(CORIMBATÁ)



Rio Claro
2012

Luá Taibo Timpone

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE TECIDO ADIPOSEO DE
PROCHILODUS LINEATUS (CORIMBATÁ)

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

Co-orientador: Bruno Fiorelini Pereira

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel Ciências Biológicas.

Rio Claro 2012

574.82 Timpone, Luá Taibo
T586a Análise morfológica de tecido adiposo de *Prochilodus lineatus*
(Corimbatá) / Luá Taibo Timpone. - Rio Claro : [s.n.], 2012
67 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Flávio Henrique Caetano
Co-Orientador: Bruno Fiorelini Pereira

1. Histologia. 2. *Prochilodus* sp. 3. Histoquímica. 4. Adipócitos. 5.
Toxicologia. 6. Piracema. I. Título.

LINHA D'ÁGUA...

*Entardecer admirando o mar,
Com suas ondulações suaves.
Canoas a deslizar na linha d'água,
Embalam meu pensamento.*

*Cardumes de enchovas,
Saltam e mergulham,
Como a ensaiar uma coreografia,
Acompanhadas pelos botos.*

*Completam a movimentação,
Crustáceos que correm na areia,
Em direção ao mar.
Extasiado! Fico a espalmar a areia...*

*Meu pensamento em disparada,
Percorreos extensos séculos,
Que deram origem a esta cena.
Em êxtase! Reverencio a obra...
Do Criador...*

Iwan Fleming Taibo

Aos

meus pais, Mônica Carvalho Taibo e Adalberto Santo Timpone
pelo incentivo, dedicação, esforço e tudo o que eu sou hoje.

Ao

Meu irmão Ian Taibo Timpone e a minha irmã Luana Taibo Timpone
pelas sábias orientações e exemplos, que me conduziram .

Aos

Meus avôs Iwan Fleming Taibo e Ângelo Timpone, e avós Carmen
Silva e Nair Sampaio de Araújo Timpone
Meus tios, tias, primos, primas e sobrinha
pela paciência, carinho, compreensão e apoio nos momentos de
ausência e pelos finais de semana perdidos.

Aos

Professores, em especial ao Dr. Guilherme Gomes e ao Dr.
Francisco M. de Souza Braga
que sempre estiveram me ajudando e me ensinando a matéria
da via.

À

Todos os integrantes da República Maresias, principalmente o
Rafael (Berne) e a Larissa
pelo apoio, compreensão e paciência no dia a dia.

Aos

Meus amigos, amigas e colegas
que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e me
proporcionando momentos inesquecíveis.

DEDICO

AGRADECIMENTO

Ao professor Dr. Flávio Henrique Caetano, pela confiança, dedicação, oportunidade, ensinamentos e orientação.

Ao Bruno Fiorelini pela dedicação e competência com que auxiliaram nas análises e coleta dos materiais.

À Vanessa Wendt Campos pelas ajudas no laboratório, com o processamento dos materiais, além de sua companhia na maioria do tempo.

À Rebeca Alves pela ajuda com as fotografias do presente projeto.

Ao Cepta-IBAMA, ao pesquisador José Senhorini e a Rita de Cássia Gimenez de Alcântara Rocha por terem cedido os animais para o experimento.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida durante a minha iniciação científica.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram e participaram da realização desse projeto.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	6
2. INTRODUÇÃO.....	7
2.1. Tipos de tecido adiposo.....	8
2.2. Biologia de <i>Prochilodus lineatus</i> (Prochilodontidae).....	10
2.2.1. Toxicidade em <i>Prochilodus lineatus</i>	12
2.3. Detergentes biodegradáveis.....	13
3. OBJETIVO.....	15
4. MATERIAL.....	16
5. METODOLOGIA.....	17
5.1. Técnicas histoquímicas e citoquímicas.....	19
5.2. Fixadores.....	20
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6.1. Análises das células adiposas.....	21
6.2. Análises do tecido adiposo dos corimbatás coletados mensalmente.....	25
6.3. Análises do tecido adiposo dos corimbatás expostos a diferentes tratamentos.....	47
6.4. Análise química da água.....	59
7. CONCLUSÕES.....	60
8. BIBLIOGRAFIA.....	61
9. ANEXOS.....	65
9.1. Relatório de análises químicas.....	65

1. RESUMO

Na sociedade moderna, a água tem um valor econômico cada vez maior. Seus múltiplos usos são indispensáveis a vários aspectos das atividades humanas, como por exemplo: ao abastecimento público e industrial, a irrigação agrícola, a produção de energia elétrica e as atividades de lazer e recreação, bem como a preservação da vida em toda a sua gama. Tendo em vista este perfil, o presente projeto visou analisar os efeitos dos poluentes presentes na água do Lago Azul (lago urbano) e dos efeitos da diluição dos detergentes biodegradáveis, em espécie de peixes de médio-grande porte: *Prochilodus lineatus* (Curimbatá). Ambos os testes foram comparados ao grupo controle, tratado com água pura retirada do poço artesiano da UNESP- Rio Claro, a qual é clorada segundo os padrões exigidos pela SABESP. Essa metodologia permitiu ampliar o conhecimento sobre o estudo de peixes neotropicais, tendo em vista a ação de poluentes antrópicos sobre a estrutura morfológica – por meio de técnicas histológicas e histoquímicas do tecido adiposo de curimbatá, devido as suas características de desintoxicação corpórea. Além disso, foram realizadas análises por meio da identificação das alterações na estrutura morfológica – por meio de técnicas histológicas e histoquímicas do tecido adiposo, ao longo do ano detectando-se alterações sazonais sutis, tendo em vista o estudo da ecologia e do comportamento dessa população, pois há poucos conhecimentos deste grupo no período migratório bem como no que diz respeito aos processos fisiológicos e morfológicos que ocorrem neste período.

2. INTRODUÇÃO

O tecido adiposo é um tipo especial de conjuntivo onde se observa a predominância de células adiposas (adipócitos) isoladas ou em pequenos grupos. O papel principal e mais bem estudado dos adipócitos é o de armazenar energia na forma de triacilgliceróis, quando a ingestão de substratos energéticos é maior que o gasto (lipogênese), e liberar energia na forma de ácidos graxos nos períodos de privação alimentar (lipólise) (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005). Sendo assim, os triglicerídeos não são depósitos estáveis e renovam-se continuamente, de acordo com estímulos hormonais, neurais e humorais.

Entretanto, as células hepáticas e o músculo esquelético também acumulam energia, mas sob a forma de glicogênio, cujas moléculas são menores e para consumo imediato, que quando comparadas ao de triglicerídeos fornecem 4,1 kcal/g de energia, contra 9,3 kcal/g de energia fornecida pelo triacilglicerol. De acordo com McWilliams *et.al.* (2004), a gordura por massa úmida contém oito a dez vezes mais energia do que outros tipos combustíveis alternativos, como o glicogênio hepático, as reservas de glicogênio muscular e as proteínas, que possuem em alto conteúdo de água (de 70% a 80%).

Em alguns estudos realizados com aves, o triacilglicerol armazenado no tecido adiposo e nos músculos (PRICE, 2010) fornece alta energia durante o voo, além disso, de acordo com Guglielmo *et al* (2002) as aves passam por mudanças sazonais na fisiologia, principalmente em períodos migratórios, que lhes permitem utilizar a gordura em altas taxas.

Segundo Melo (2002), Carvalho & Collares-Buzato (2005), Alberts *et al* (2006) e Junqueira & Carneiro (2008), nos animais de maneira geral o tecido adiposo, além do papel energético, desempenha outras funções, como por exemplo: modelar superfícies, por localizar-se embaixo da pele; absorver o impacto de choques mecânicos, através de coxins absorventes; contribuir para o isolamento térmico do organismo, visto que a gordura é má condutora de calor; preencher o espaço entre outros tecidos, auxiliando no posicionamento de certos órgãos; e realizar atividade

secretora de diversos tipos de moléculas. Algumas delas podem estar no elenco de funções deste tecido nos peixes.

Segundo Melo (2002), Carvalho & Collares-Buzato (2005), Alberts *et al* (2006) e Junqueira & Carneiro (2008), no fígado, o adipócito é especializado na esterificação de ácidos graxos e na sua liberação a partir de triacilgliceróis (TG), na forma de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL). Na corrente sanguínea, esses TG são transportados pelos quilomícrons e as VLDL sofrem ação da lipoproteína lipase, enzima sintetizada no adipócito e secretada para as células endoteliais adjacentes. Os ácidos graxos liberados são captados pelo adipócito, ativados na acetil-coenzima A e transferidos ao glicerol, porém os adipócitos são incapazes de fosforilar os gliceróis, por não possuírem as respectivas quinases, logo precisam de glicose para sintetizar TG.

Contudo, Raclot (2003) fez uma recente revisão bibliográfica e concluiu que a mobilização dos ácidos graxos ocorre de acordo com a estrutura molecular de cada tipo, ou seja, ácidos graxos que são mais curtos, insaturados e que tem ligações duplas mais próximas da extremidade metil, são altamente polares, logo possuem uma preferencia quando comparado aos outros tipos de tecido adiposo. Isso pode ocorrer devido a uma combinação de especificidade da enzima para lipídios polares na interface lipídio aquoso e ao transporte de lipídios, além de outros processos dentro do adipócito (RACLOT, 2003; RACLOT *et al*, 2001).

Sendo assim, Price *et.al* (2007) analisou a mobilização seletiva de ácido graxo do tecido adiposo de duas espécies de aves migratórias e verificou que a mobilização dos ácidos graxos provenientes dos adipócitos é geralmente mais rápido em ácidos graxos insaturados, bem como para os mais curtos. Contudo, ainda há especulações sobre a relação da mobilidade dos ácidos graxos insaturados e seu carácter benéfico para o desempenho migratório, principalmente de aves.

2.1. Tipos de tecido adiposo

O desenvolvimento do tecido adiposo ocorre, sobretudo, no nascimento, mas o número de células adiposas pode aumentar ao longo de toda a vida em resposta às variações nutricionais e fisiológicas. A adipogênese é o resultado de uma remodelação do padrão de transcrição gênica com ativação e repressão de

considerável número de genes, os quais atuam cooperativamente e seqüencialmente determinando a diferenciação programada de células precursoras dos adipócitos (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Existem duas variedades de tecido adiposo, que diferem em sua morfologia, função, quantidade e distribuição no corpo. São eles: tecido adiposo comum, amarelo ou unilocular, cujas células, quando completamente desenvolvidas, contêm apenas uma gotícula de gordura que ocupa quase todo o citoplasma. E tecido adiposo pardo, marrom ou multilocular, cujas células contêm várias inclusões lipídicas menores e muitas mitocôndrias em seu citoplasma. Nos peixes encontra-se o tipo unilocular, com núcleos periféricos (MUMFORD *et al*, 2010).

Esses dois tipos de tecidos são originados a partir dos pré-adipócitos, os quais são originados pelas células mesenquimais. Sob a influência da insulina, ligada ao fator de crescimento-1, os pré-adipócitos sintetizam lipoproteína lipase e acumulam gordura em pequenas gotículas. No adulto, múltiplas gotículas lipídicas coalescem para formar uma única gotícula de gordura (KIERSZENNBAUM, 2004).

O tecido adiposo unilocular tem uma cor que varia entre o branco e o amarelo-escuro dependendo da dieta. Essa coloração deve-se principalmente ao acúmulo de carotenos dissolvidos nas gotículas de gordura (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Suas células adiposas são grandes, podendo apresentar um formato esférico quando estão isoladas, e poliédricas quando estão agrupadas, em razão da deformação mútua provocada pela íntima compressão das células.

A função principal desse tipo de tecido é armazenar energia nos períodos de abundância de substratos energéticos e no fornecimento de energia (ácidos graxos) nos períodos de privação alimentar (jejum) (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

Segundo Mumford *et al* (2010), as células de gordura são totalmente diferenciadas e incapazes de sofrer divisão mitótica, portanto elas surgem como diferenciação de células primitivas, provavelmente de células mesenquimais indiferenciadas presentes no corpo. Primeiramente, ocorre o aparecimento de pequenas gotículas de gordura, as quais aumentam de tamanho e acabam se aglutinando para formar uma única grande gota. De acordo com o seu tamanho a

célula apresentará diferentes graus de deformação, como por exemplo, o citoplasma pode ficar restrito a uma fina camada e o núcleo achatar-se.

Na maioria dos peixes, para o período reprodutivo ocorre acumulação de material nutriente composto por lipídios e proteínas, os quais constituíram o vitelo, proporcionando um aumento da lipólise nos adipócitos para liberação de lipídio. Este vitelo será de grande importância para o crescimento e desenvolvimento do embrião, visto que será sua única fonte de nutrientes até o momento que for capaz de capturar alimento exógeno. Sendo assim, a mobilização para formação deste vitelo está relacionada ao tamanho do peixe, ao seu estado nutricional, às condições ambientais e à forma de cuidado parental, pois o vitelo tende a ser mais abundante em espécies caracterizadas por pouco ou nenhum cuidado parental, assim como ocorre em corimbatás (BALDISSEROTTO, 2009).

Desta forma, a deposição de gordura visceral durante todo o ciclo de vida do peixe, cujos ovócitos em desenvolvimento utilizam essa reserva energética como principal fonte de nutriente, tem a tendência de aumentar nos períodos pré-reprodutivos e diminuir com a proximidade da desova (NIKOLSKY, 1963, 1969). De acordo com Braga *et al.* (2008) esse processo reprodutivo dinâmico pode ser verificado através da interação das variações sazonais dos estádios de maturidade gonadal com a relação gonadossomática; visto que esta associação permite o reconhecimento do período reprodutivo.

2.2. Biologia de *Prochilodus lineatus* (PROCHILODONTIDAE)

As espécies da família Prochilodontidae (onde está incluído o gênero *Prochilodus*) possuem como características em comum corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimenta-se de detritos nos fundos lamacentos), reofilias (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema (SILVA, 2006). O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região neotropical, e possui 13 espécies descritas até o momento. Quanto à morfologia, os representantes desse gênero possuem lábios grossos, móveis e providos de dentículos, as escamas são do tipo ecnóides formando o anel etário durante a época de desova.

Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimbatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimbatá

(SILVA, 2006). E possuem características reprodutivas em comum, tais como: desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidado parental.

Segundo Baldisserotto (2009), o longo foto-período e o aumento da temperatura da água estimulam o crescimento das gônadas nas espécies que realizam a desova na primavera ou no início do verão, como por exemplo, em *P. affinis* e *P. marggrani*, em que a elevação da temperatura de 21°C para 24°C induz a maturação sexual e a desova. Tal fenômeno ocorre devido à ação direta da temperatura em diversos aspectos do desenvolvimento reprodutivo, dentre eles pode-se citar a gametogênese, a secreção de gonadotrofinas, a resposta de ação dos estrógenos sobre a produção de vitelogenia pelo fígado e a resposta das gônadas à estimulação hormonal.

A espécie *Prochilodus lineatus*, conhecida popularmente como corimbatá, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil). O corimbatá tem um ótimo potencial para a piscicultura por ter um baixo custo de produção, tornando-se uma alternativa economicamente atrativa. Devido a essa importância econômica, a sua biologia bem conhecida e a sua sensibilidade a poluentes, esta espécie é apropriada para testes de toxicidade (MADUENHO ET. AL 2007).

Além disso, os corimbatá possuem escamas tipicamente ciclóides, as quais apresentam circuli e annuli bem formados e visíveis; o que contribui para estudos de verificação da validade do annulus como marca de idade anual. De acordo com Godoy (1975), de acordo com suas observações realizadas na bacia hidrográfica dos rios Mogi-Gaçu/Pardo/Grande, num período de dez anos, bem como as observações ocasionais, evidenciaram que esse annulus se forma nas escamas do corumbatá entre outubro e janeiro, para ambos os sexos, exatamente quando estão fazendo a migração reprodutiva ascendente. De acordo com Barbieri *et al.* (2000), esta é uma espécie que apresenta um período de reprodução curto, característico de peixes com desova total, nos períodos de novembro à janeiro.

O fenômeno da Piracema é caracterizado pela presença de centenas de corumbatás chegando perto da barragem em Cachoeira das Emas, com uma escada em forma de degrau-tanque, cujos fundos são constituídos pelo próprio leito rochoso. Segundo Godoy (1975), em sua pesquisa de campo de novembro de 1994;

milhares de curumbatás e outros peixes saltavam acima da superfície fluvial; e os curumbatás machos emitiam os seus roncos nupciais característicos atraindo as fêmeas.

Sendo assim, toda essa demanda de energia – para o movimento migratório e para a preparação das gônadas - não é suprida apenas pela alimentação, faz-se necessário o consumo das energias acumuladas, sobretudo das gorduras que chegam a valer entre 6 e 15% do peso do animal. Com destaque para as fêmeas, que podem apresentar a porcentagem média de 24% para o peso dos dois ovários em relação ao peso total, no período entre novembro e janeiro (GODOY, 1975).

2.2.1. Toxicidade em *Prochilodus* sp.

O avanço do setor industrial tem proporcionado um crescimento muitas vezes desordenado do território, de forma que pode gerar graves consequências ao meio ambiente, como por exemplo, a poluição de rios e de lençóis freáticos, ocasionados pelo despejo de resíduos químicos na água sem o devido tratamento. Em vista disto, vários estudiosos tem analisado o efeito da toxicidade nos peixes.

Mazon (1999) avaliou o acúmulo diferenciado de cobre nos tecidos de *Prochilodus scrofa*, espécie autóctone do Rio Mogi-Iguaçu. Neste trabalho, o autor obteve dados importantes sobre a toxicidade do cobre nesses peixes, contribuindo para o desenvolvimento de critérios de qualidade da água para o monitoramento ambiental. Este mesmo autor concluiu, ainda, que a concentração de cobre no plasma pode indicar uma relação entre as concentrações de cobre na água e o limite de tolerância dos peixes, ou seja, o aumento do nível de metal em água leva à produção de uma proteína com ligação ao metal, como a metallothioneins, a qual é armazenada nos hepatócitos ligados ao cobre. O excesso de metal é unido à uma globulina no fígado, produzindo ceruloplasmina, que é excretada através dos rins. Porém, quando expostos a níveis elevados de cobre, o fígado não é capaz de suprir tal demanda, e assim, o cobre é transportado pelo sangue para outros órgãos. Portanto aumentando a quantidade de cobre no sangue reflete o limite de tolerância do peixe.

Outro estudo nesta área foi o desenvolvido por Martinez (2004), que analisou a exposição de *Prochilodus lineatus* ao chumbo, através, da determinação da concentração de glicose do plasma sanguíneo, obtidas por espectrofotometria, foi possível determinar a concentração de lipídios, colesterol total e proteínas totais.

Considerando que a alta concentração deste íon pode ser empregada para quantificar os efeitos tóxicos desse metal durante a exposição (MAYER *et al.*, 1992).

Martinez (2004) concluiu que as concentrações de glicose do sangue aumentaram significativamente em animais expostos a 24 mg Pb.L⁻¹ durante 6 e 12 h e a concentração de lipídios diminuíram, significativamente, após 6 h de exposição a mesma concentração de chumbo. Em peixes expostos a 0,1 mg Pb.L⁻¹ durante 6 e 24 h, a concentração de glicose no sangue aumentou significativamente. Considerando que a concentração de lipídio diminuiu significativamente em relação aos valores de controle. Estes animais também apresentaram uma redução significativa de proteínas no sangue em períodos experimentais, depois que as concentrações de colesterol de 24 h. diminuíram de forma constante em todos os tempos de exposição.

Sendo assim, dentre os efeitos metabólicos do chumbo incluem a hiperglicemia, o esgotamento das reservas de glicogenio, catabolismo de proteína muscular e a alteração sanguínea dos níveis de proteínas, colesterol e ácidos graxos livres (THOMAS, 1990; JOBLING, 1994; WENDELAAR BONGA, 1997). Deste modo o tecido adiposo poderá ser um dos locais de armazenamento de produtos que não foram metabolizados e/ou excretados pelo animal.

2.3. Detergentes biodegradáveis

Populações de peixes são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja a introdução de espécies exóticas, de detritos industriais ou residuais, derramamento de óleo, de pesticidas ou de outros agentes, que podem afetar diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies.

Os detergentes biodegradáveis, compostos à base de dodecil-benzeno-sulfonado de sódio, são considerados detergentes brandos, por possuírem uma cadeia lateral linear alifática. Os detergentes utilizados atualmente têm sido alvo de críticas. Não se trata apenas do problema da biodegradação, mas também do elevado teor de fosfato (de até 50%) que aumenta a eficiência na limpeza e é responsável pelo aumento na velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninha, quando as águas residuais são despejadas em rios e lagos. Esse processo é conhecido como eutrofização, que faz com que diminua o teor de

oxigênio disponível nas águas, com efeitos graves sobre a vida animal (ALLINGER *et al.*, 1978).

Desta forma, o principal canal de drenagem fluvial do município de Rio Claro é o rio Corumbataí, que ao longo de seu curso, em perímetro urbano, recebe contribuições de afluentes como o ribeirão Claro e o córrego Servidão, cuja nascente é próxima à Rodovia Washington Luís e, segundo De Mauro (1993), sofreu por um longo período com a deposição de efluentes advindo da Empresa Química Nheel.

Em 1970, o córrego da Servidão foi represado originando o "Lago Azul", situado no perímetro urbano de Rio Claro, SP. Devido a sua localização geográfica, as águas provenientes do escoamento superficial das ruas dos bairros, situados à montante, carreavam grande carga de sedimentos (terra, lixo, entulho) para o Lago, fato que resultou em seu assoreamento gradual, culminando na formação de um brejo.

O córrego da Servidão passou por obras de canalização e atualmente encontra-se confinado sob a Avenida Visconde do Rio Claro, entretanto, problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto são verificados em diferentes pontos deste córrego e também no Lago Azul.

Estes problemas são resultantes da ineficiência do processo de planejamento das obras, pois antes do represamento e da alteração do curso do córrego fazia-se necessário um planejamento sério que contemplasse a preservação e a recuperação da vegetação, bem como a organização da ocupação das encostas e do vale do córrego da Servidão.

Preocupada com a possível contaminação das espécies existentes no lago, a prefeitura de Rio Claro proibiu a pesca e, juntamente com a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado São Paulo), iniciou um estudo das águas e sedimentos do Lago Azul. Cabe ressaltar que, sendo o Lago Azul um represamento do córrego da Servidão, afluente direto do rio Corumbataí, este corpo d'água fluvial, bem como sua fauna, são diretamente afetados pelos despejos e impactos impostos ao Lago.

3. OBJETIVO

O vigente projeto se inseriu na linha de pesquisa de histologia, ultra estrutura, desenvolvida nos laboratórios de Histologia e Microscopia Eletrônica, do Departamento de Biologia da UNESP, Rio Claro, e no Laboratório de Reprodução de Peixes localizado no ICMBio/CEPTA – Pirassununga, e visou implementar uma nova metodologia de estudo toxicológico em peixes. Teve para o seu desenvolvimento a participação dos Drs. José Augusto Senhorini e Rita de Cássia Gimenez de Alcântara Rocha, na reprodução das espécies nos laboratórios do ICMBio/CEPTA.

Este projeto foi realizado com a espécie *Prochilodus lineatus*, a qual foi exposta a uma diluição de detergentes biodegradáveis e a água comprovadamente contaminada do Lago Azul – Rio Claro – SP, comparados a um grupo controle, mantido em água pura e clorada. Com isso os objetivos deste trabalho foram:

- Identificar as possíveis alterações morfológicas no tecido adiposo, causadas pelos poluentes testados, bem como o possível agravamento ou surgimento de tais danos com o decorrer do tempo de exposição.
- Correlacionar as possíveis modificações morfológicas com os compostos químicos encontrados nos tratamentos, após a análise química da água, através da comparação com artigos realizados na área de ecotoxicologia.
- Verificar as alterações morfológicas no tecido adiposo ao longo do ano, de acordo com o fenômeno da Piracema.

4. MATERIAL

Neste projeto foram utilizados sessenta indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus*, no mesmo estágio de desenvolvimento, obtidos junto ao ICMBio/CEPTA – Pirassununga, SP, que foram amostrados no rio Mogi-Guaçu e mantidos na estação de piscicultura do ICMBio/CEPTA.

Os peixes foram mantidos em três caixas de polietileno com capacidade de 500 litros cada, que receberão amostras de água dos dois tratamentos e do controle. Tratamento 1: água com poluentes do tipo detergentes biodegradáveis (ver método para as concentrações); Tratamento 2: água proveniente do Lago Azul (Rio Claro, SP) com altos níveis de poluentes dissolvidos; Controle: água limpa e clorada coletada no poço artesiano, situado na UNESP (Rio Claro).

Para as análises histológicas foram utilizadas as instalações do Laboratório de Histologia da UNESP – Rio Claro e microscópios Leica CM 2000 provido de câmera para captura de imagens.

5. METODOLOGIA

Os animais foram divididos em três grupos, de 20 indivíduos, cada qual num tanque com capacidade de 500 litros (figura 1) e alimentados diariamente, com a mesma ração que lhes era dada no ICMBio/CEPTA. O primeiro tanque foi do grupo controle, tratado com água pura e clorada; no segundo tanque os animais foram expostos à diluição de várias marcas de detergente (Limpol, Ypê, Minuano, Qualitá, Amazon, Ariel, Colmax, Alpes, Lipon e Surf), na proporção de 1:1000000; no terceiro tanque os animais serão tratados com água do Lago Azul-Rio Claro-SP.

Poucos estudos abordam os valores de toxicidade dos detergentes biodegradáveis, segundo Roy (1988) a DL50 para diversos grupos de peixes varia entre 7ppm e 22,5ppm. Nesse sentido, o presente estudo utilizou uma diluição de 1ppm, pois visou detectar alterações morfológicas com níveis baixíssimos de agentes poluentes, tendo em vista que a diluição de detergentes em rios, não deve exceder este valor. Esta concentração foi mensurada, pois nenhum órgão de fiscalização e controle de águas possui dados relativos aos níveis detergentes tanto em lagos, quanto em rios. Assim como Roy (1988) descreveu que em seu trabalho, a água imediatamente próxima aos locais de descarte de resíduos urbanos apresenta uma concentração que não atinge os valores mínimos da DL50, acreditamos que no corpo de água a concentração não deve ultrapassar a concentração testada.



Figura 1: Estrutura montada na UNESP – Campus de Rio Claro, contendo caixas de polietileno de 500L, nas quais parte do experimento será realizado.

Para uma melhor análise dos resultados obtidos, amostras das águas do grupo controle e dos dois tratamentos, foram analisadas no Laboratório de Análise de Águas do Departamento de Geologia Aplicada do Instituto de Geociências e Ciências Exatas – UNESP – Campus de Rio Claro. Estas análises foram realizadas para os dois experimentos deste trabalho, seguindo as normas do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, para os parâmetros descritos abaixo:

Foi realizada a determinação de metais por ICP-AES para os elementos: Mg, Ca, Sr, Ba, Cr(t), Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Si, P(t) e Pb. Os ânions: F^- , Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} , ClO_2^- , acetato e oxalato mais os cátions Li, Na, NH_4^+ e K foram determinados por cromatografia iônica. E foi realizado também a análise de pH, condutividade, alcalinidade total e carbonatos por titulação potenciométrica.

Para a análise da deposição de tecido adiposo durante o ano foram feitas coletas mensais, nas quais foram coletados quatro indivíduos. Estas coletas foram realizadas juntamente com o projeto desenvolvido pelo CEPTA de “Peixes migratórios do Rio Mogi-Guaçu”, realizado na Cachoeira de Emas no Rio Mogi-Guaçu da cidade de Pirassununga. Neste projeto, os indivíduos foram sacrificados para a identificação do estágio de maturação das gônadas e para a retirada do tecido adiposo, da região ventral, com finalidade de análise ao vigente projeto. Os procedimentos de coleta realizados acima foram os mesmos que os dos peixes expostos aos poluentes.

Antes de serem sacrificados, para a coleta dos órgãos que foram analisados, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada), para amenizar sofrimento dos indivíduos durante o processo de dissecação. Para as análises de histologia e histoquímica, o tecido adiposo foi fixado em Bouin e Paraformaldeído 4%, tamponados em tampão sulfato de sódio e incluídos em parafina, para as reações de Hematoxilina e Eosina, Azul de Toluidina Ácido, Picrossirius e PAS, descritas no item 4.1.

5.1. Técnicas histoquímicas e citoquímicas

Hematoxilina e Eosina (HE)

Segundo Paulete & Beçak (1976) esta técnica é composta dos reagentes Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo celular de azul, e Eosina, que possui características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa.

Os procedimentos da técnica são: deixar as lâminas em água destilada por 1 min; corar com hematoxilina por 5min; reagir com água por 4min; lavar em água corrente; corar com eosina por 5min e lavar as lâminas em água corrente.

Azul de Toluidina ácido

Este método cora as estruturas ácidas das células e é muito utilizado para o estudo de DNA e RNA (núcleo, ergastoplasma, corpúsculo de Nissl, etc.). O azul de Toluidina é um corante básico que forma ligações eletrostáticas com os radicais ácidos presentes nos tecidos. As estruturas ácidas dos tecidos (RNA, DNA, polissacarídeos ácidos coram-se em azul) (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983).

Esta técnica decorre da seguinte forma: corar com Azul de Toluidina a 60°C por 1h; lavar com água destilada e imergir por 30seg em solução aquosa a 1% de molibdato de potássio.

Picrosirius Red

Este método consiste na coloração da proteína colágeno presente nas fibras colágenas, nas fibras reticulares, nas cartilagens e nas membranas basais em vermelho pelo Sirius Red (JUNQUEIRA & JUNQUEIRA, 1983). E seu procedimento consiste em: corar à 60°C, durante 60 min, com a solução de Picrosirius e lavar com água destilada.

PAS (Ácido Periódico de Schiff)

De acordo com Paulete & Beçak (1976) o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar à formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff, desta forma as regiões com presença de glucídios coram-se de vermelhos arroxeados. A técnica se aplica através dos seguintes procedimentos: reagir o material com ácido periódico 0,4% por 10min, lavar em água destilada, reagir com o reativo de Schiff por 1h no escuro, lavar em água sulfurosa (3 banhos de 1min. cada), e lavar em água corrente por 10min.

5.2. Fixadores

Bouin

De acordo com Paulete & Beçak (1976), este fixador é constituído por 750 ml de solução saturada de ácido pícrico, 50 ml de ácido acético glacial, ácido pícrico em solução saturada aquosa, o qual é obtido pela dissolução de 1,5g de ácido pícrico em 100mL de água destilada quente, que deve ser agitada e filtrada no dia seguinte.

Paraformaldeído 4%

O paraformaldeído é um fixador mais amplamente usado para inclusão em paraplast. Embora sua alta toxicidade, este fixador preserva a morfologia do tecido com qualidade. Sua composição consiste de 1 volume de Paraformaldeído(20%) para 4 volumes de água destilada.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As lâminas, após prontas, foram fotografadas por um microscópio provido de câmera de captura de imagens Leica DM 2000. Cabe aqui ressaltar que não houve a coleta de tecido dos indivíduos expostos ao tratamento do lago Azul, pois eles não sobreviveram ao tratamento. As fotografias assim obtidas foram analisadas por comparação, ou seja, as lâminas obtidas a partir dos tecidos dos peixes expostos aos poluentes foram comparadas entre si e com o grupo controle. Com a finalidade de verificar os possíveis efeitos dos poluentes, produzidos pelo homem, no tecido adiposo dos peixes.

Os dados obtidos a partir do tecido daqueles envolvidos no período reprodutivo e não reprodutivo, também, foram comparados entre si, a fim de afirmar com maior precisão as variações da quantidade e da morfologia do tecido adiposo. Entre os períodos de maior necessidade energética (reprodutivo) e o de menor necessidade (não reprodutivo).

6.1. Análises das células adiposas

As figuras 1 a 4 mostram os vários aspectos do tecido adiposo ao longo do ano. No tecido adiposo verifica-se a presença de vasos sanguíneos, indicando uma rica vascularização do mesmo.

Como é possível observar na figura 1 a técnica de HE teve reação no tecido conjuntivo que envolve as células adiposas e o complexo de vasos sanguíneos, porém sem reagir com o material do citoplasma o qual foi removido com a gota lipídica.

Segundo Ahima e Flier (2000), o tecido adiposo é um conjuntivo frouxo composto de células – adipócitos - com muito lipídio, envoltas por uma matriz de fibras colágenas, vasos sanguíneos, fibroblastos e células do sistema imunológico. Em certas áreas, por exemplo, subcutânea e regiões mesentérico, este tecido é organizado em grandes estruturas lobulares.

De acordo com Junqueira e Carneiro (2008), existem dois tipos de tecido adiposo: o unilocular e o multilocular, sendo que o unilocular é caracterizado pela presença de apenas uma gotícula de gordura que ocupa quase todo o citoplasma.

Nossos dados para *P. lineatus* corroboram os de Ahima e Flier (2000) para peixes em geral, que demonstraram ser o tecido adiposo de peixes do tipo unilocular. Assim como se pode observar nas figuras representadas o deslocamento do núcleo para a periferia do tecido, uma única gota de lipídio central e um citoplasma como mínima porção do tecido concordam com o descrito por Junqueira e Carneiro (2008). Fazemos aqui uma ressalva, pois em nossos dados, com as técnicas aqui utilizadas, não foi detectado o citoplasma residual descrito por estes autores. Além disso, a rica vascularização pode ser justificada pelo fato de os triglicerídeos, formadores da gotícula de lipídio, não serem depósitos estáveis, pois são sensíveis aos estímulos hormonais, neurais e humorais, logo estão em constante renovação, por isso da importância de uma eficiente vascularização do tecido (CARVALHO & COLLARES-BUZATO, 2005).

A síntese de lipídios ocorre, principalmente, no retículo endoplasmático liso, onde as enzimas se localizam para a síntese de triglicerídeos, fosfolipídios e esteroides, formando gotículas de lipoproteínas, para posterior secreção pela célula.

Segundo Fonseca-Alaniz *et al* (2006), a descoberta de uma grande variedade de adipocinas, proteínas secretadas pelo tecido adiposo unilocular, permitiu o surgimento de um novo conceito sobre a função biológica do mesmo, pois esse estaria envolvido em diversos processos metabólicos e fisiológicos, desta forma, não seria responsável apenas pelo fornecimento de energia.

Além disso, Geneser (2003) verificou que as células adiposas uniloculares além de serem muito grandes podem variar em tamanho, mas após o procedimento histoquímico elas se deformam, porque os lipídios se dissolvem durante a preparação, adotando formas poliédricas, fato este que se pode observar em algumas regiões das lâminas histológicas obtidas de *P. lineatus*.

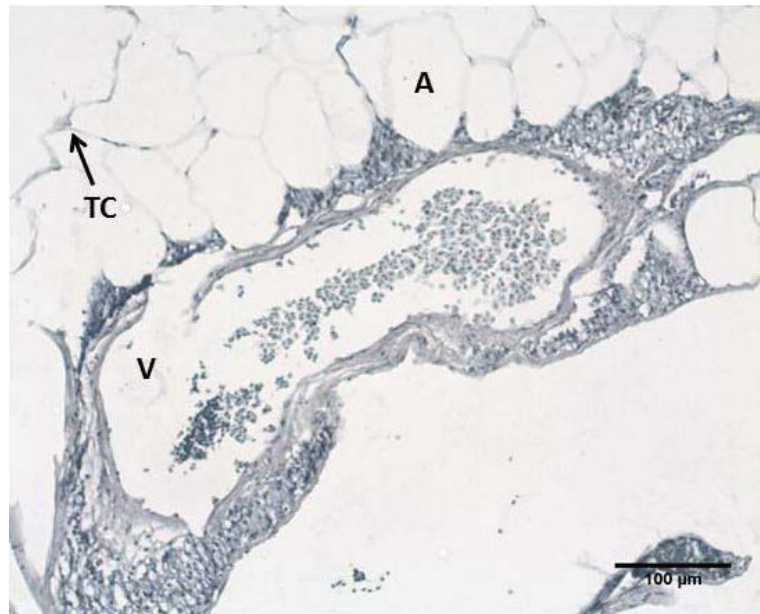


Figura 1: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês dezembro de 2010, mostrando um vaso sanguíneo em meio aos adipócitos uniloculares. Note a ausência de citoplasma nos adipócitos - HE.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

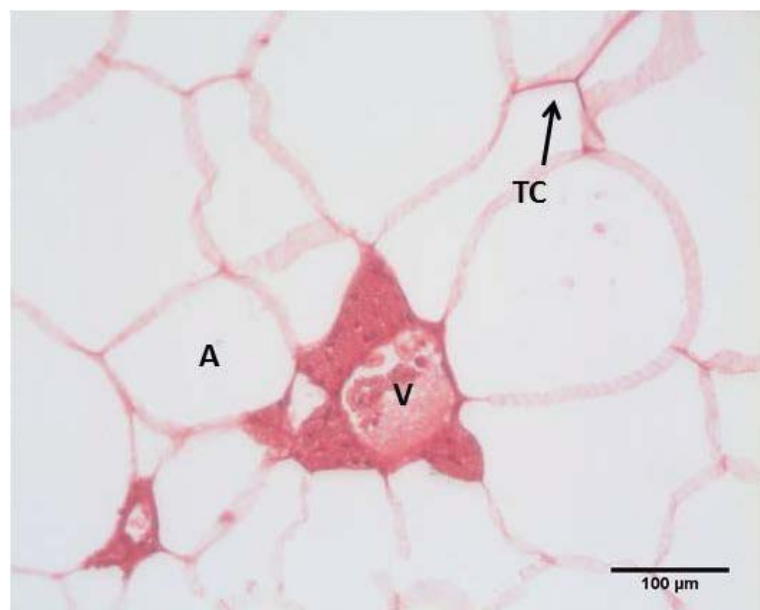


Figura 2: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês de janeiro de 2011- Picrosirius.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo

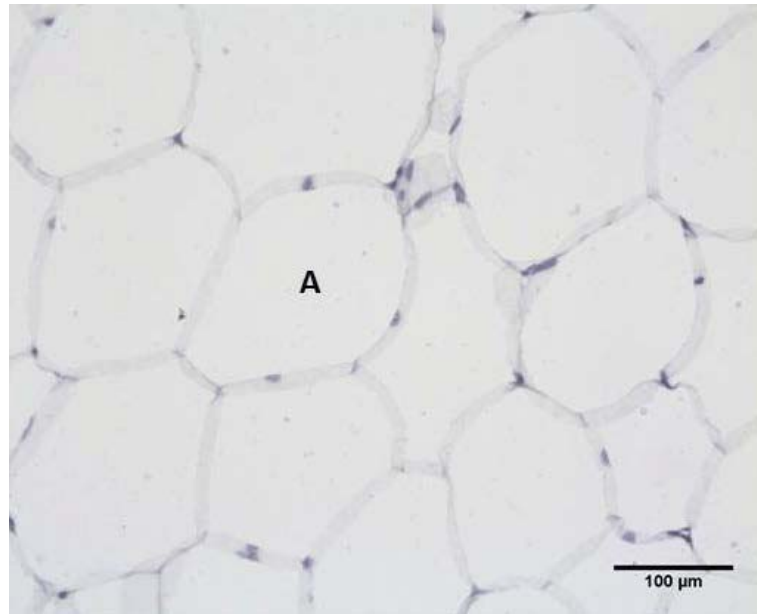


Figura 3: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês de janeiro de 2011 - Azul de Toluidina.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

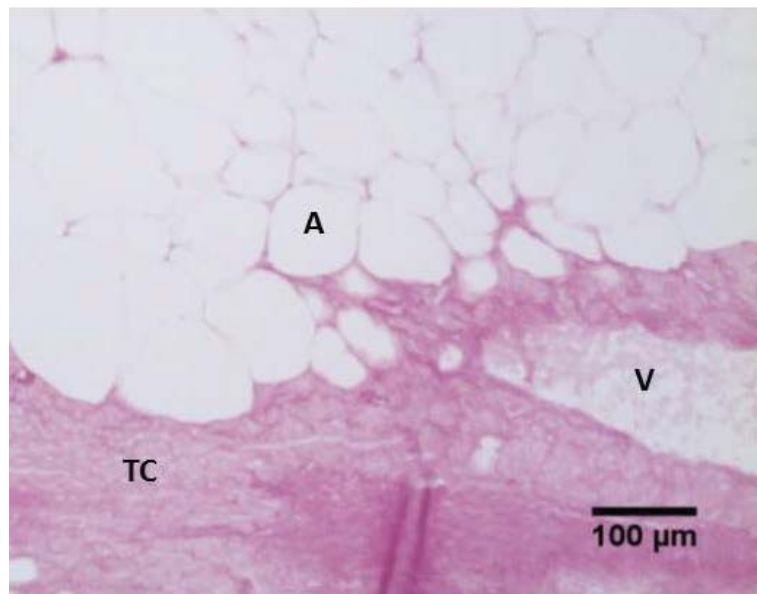


Figura 4: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês de dezembro de 2010 - PAS.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

6.2. Análises do tecido dos corimbatás coletados mensalmente

Agora, para melhor entender o que foi observado na coleta de dados deste projeto é apresentada abaixo uma série de figuras (5 a 12) de material submetido à mesma técnica (HE).

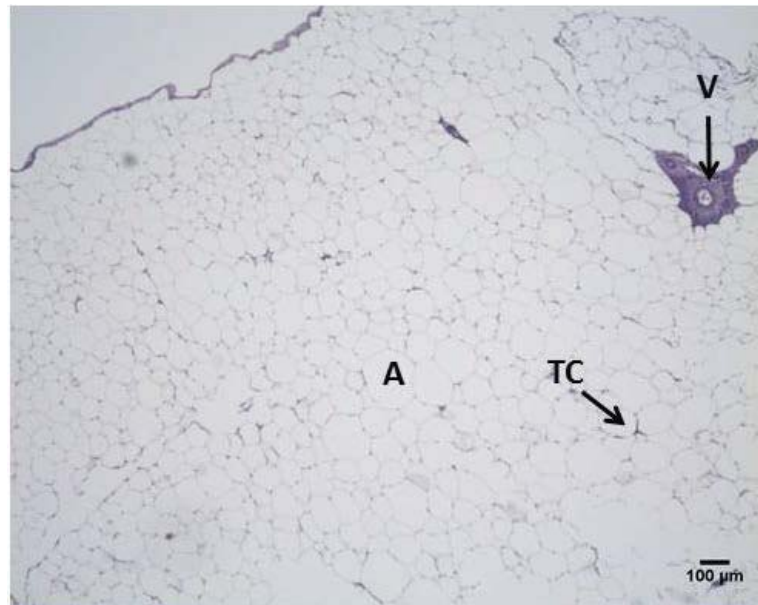


Figura 5: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês janeiro de 2011 - HE.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

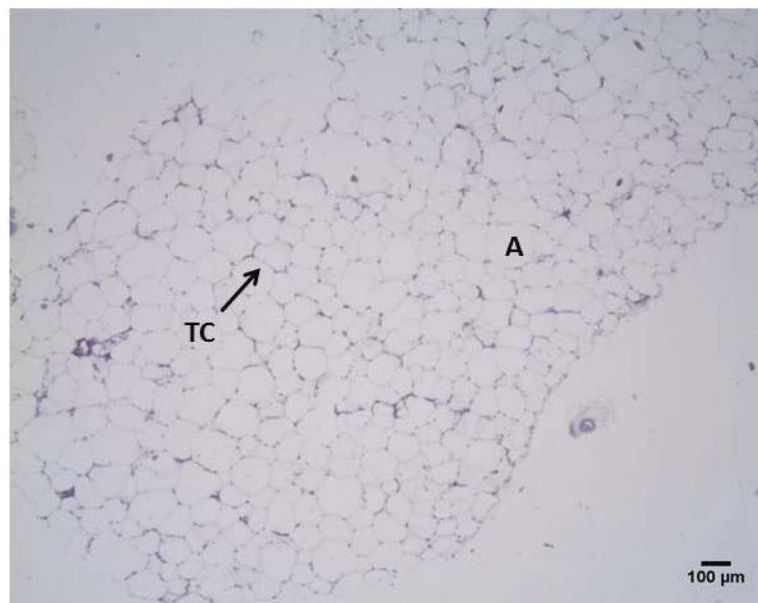


Figura 6: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês março de 2011 - HE.

A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

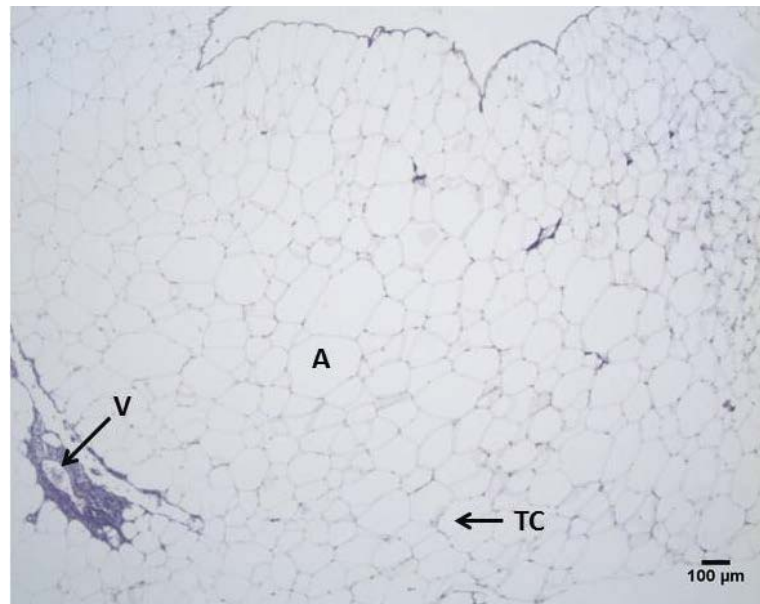


Figura 7: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês abril de 2011 - HE.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

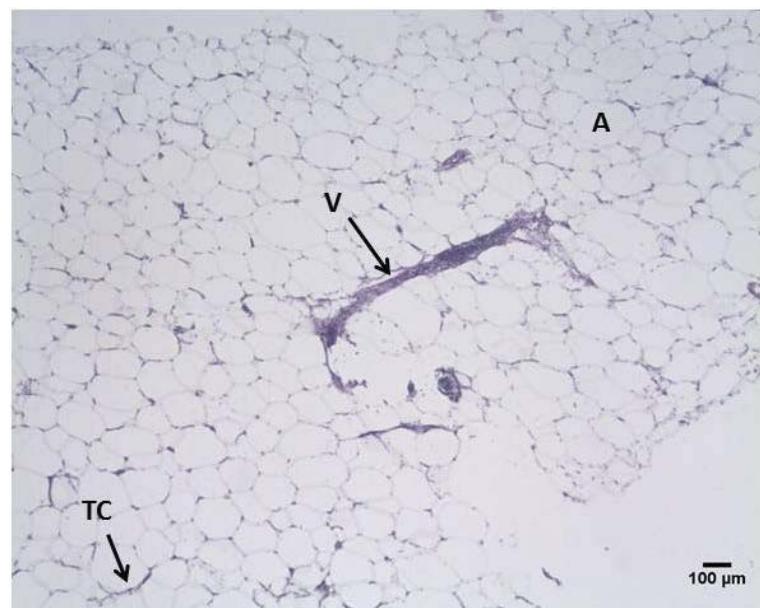


Figura 8: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês maio de 2011 - HE.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

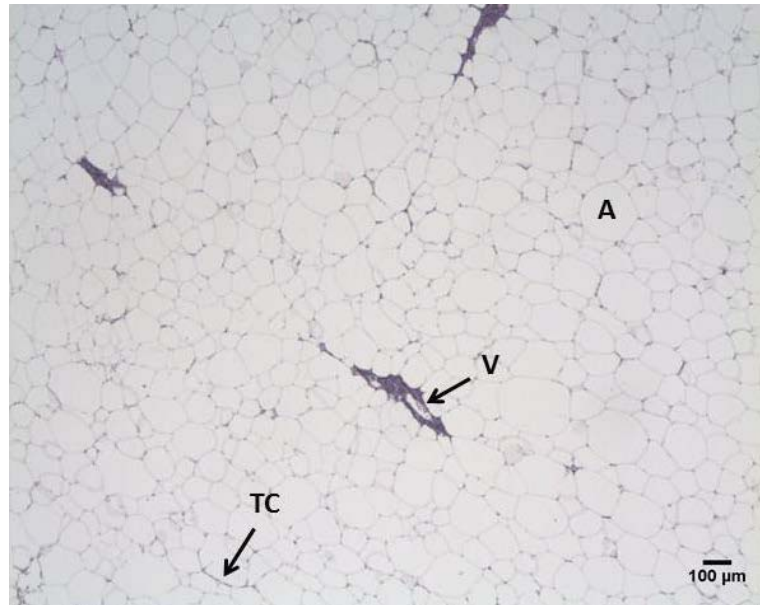


Figura 9: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês junho de 2011 - HE.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

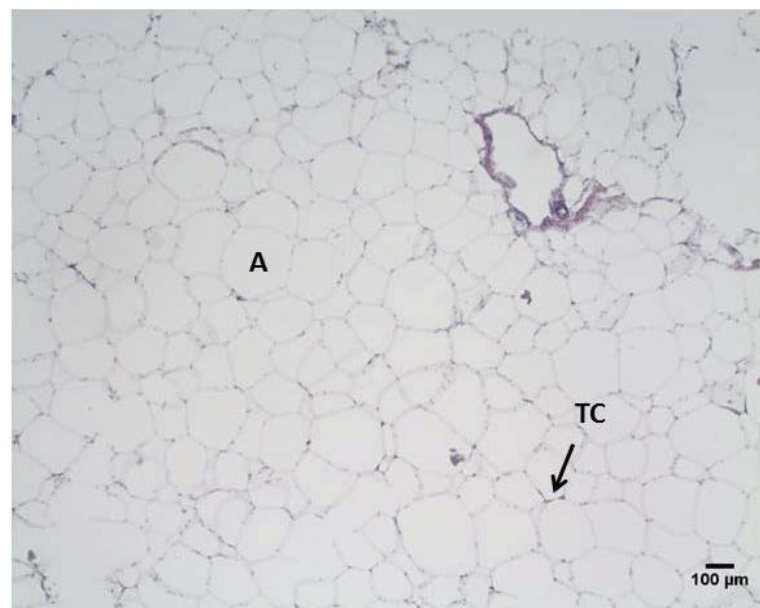


Figura 10: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês agosto de 2011 - HE.

A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

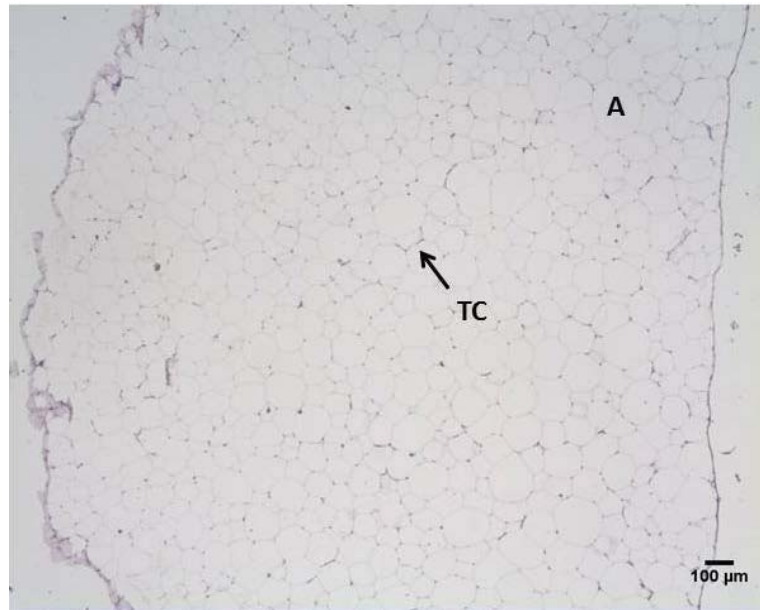


Figura 11: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês outubro de 2011 - HE.

A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

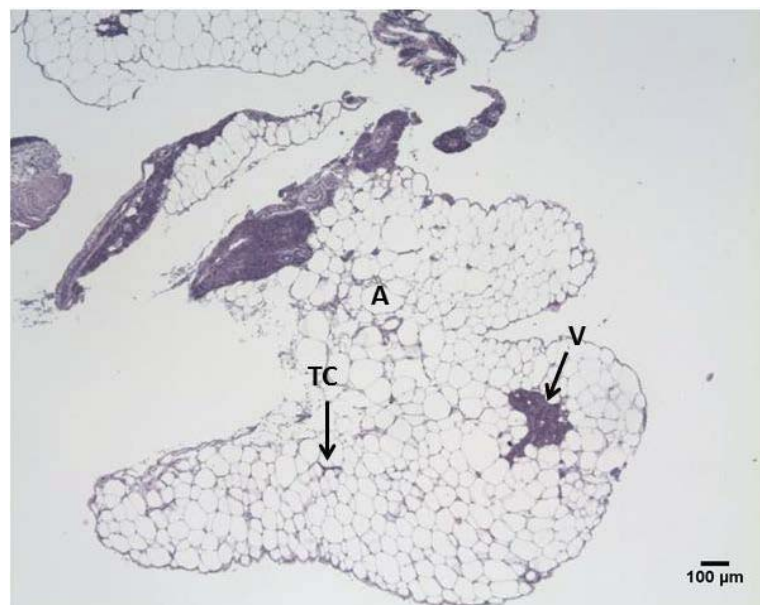


Figura 12: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês novembro de 2011 - HE.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

Vale à pena ressaltar que o que se observa é o vazio deixado pela remoção do lipídio, portanto uma “cicatriz” do mesmo.

As figuras 16 a 25 sugerem que ocorre a redução do tamanho dos adipócitos logo após o período de preparação para a reprodução (dezembro fig. 16 a janeiro fig. 17). Após este período os adipócitos voltam a aumentar de tamanho preparando-

se para o período de baixa oferta de nutriente (março, fig. 19; abril, fig. 20; e maio, fig. 21) com o acúmulo de lipídio.

No mês de junho (Fig. 22), mês que representa a redução do alimento disponível (o mesmo acontecendo com os dados referentes ao mês de julho) e com isto o consumo das reservas acumuladas nos adipócitos. Assim como observou Cyrino (1979), através da análise físico-química da água do Rio Mogi-Guaçu este autor observou uma acentuada alteração da mesma no período de junho a setembro, afirmando ser não ser consequência apenas do frio e da estiagem, como também da poluição açucareira a que o rio está submetido, visto que esta provoca uma acentuada redução da fauna íctica do rio.

Já no mês de agosto, provavelmente pelos peixes estarem em um lar de alimentação, os adipócitos voltam a acumular o lipídio, fato evidente pelo aumento do tamanho dos adipócitos (Fig.23).

Desta forma pode-se afirmar que a gordura visceral é uma importante fonte de reserva para o crescimento o curimatá, visto que o crescimento específico de um peixe será maior quanto mais novo ele for, sendo assim existe uma estreita relação entre o gasto energético e a taxa de crescimento – quanto maior a taxa de crescimento, maior o gasto energético. Além do que, os indivíduos maiores necessitam de uma menor quantidade de alimento, logo sobrará mais energia oriunda dos alimentos para promover o crescimento (BALDISSEROTTO, 2009).

Capeleti (1993) verificou que a migração rio acima (com finalidade reprodutiva) de curimatás atinge seu ápice nos meses de setembro e outubro, coincidindo com as primeiras chuvas e aumento da temperatura. De forma que esses peixes nadam por volta de 1.200 a 1.400 km, permitindo inferir que o metabolismo dos mesmos está relacionado à necessidade biológica da natação, cujo fator condiciona a maturação das gônadas, e o desencadeamento do evento reprodutivo (tabela: 1).

Oliveira (1997) procurou relacionar o estágio de maturação gonadal de *Prochilodus nigricans* com o ciclo hidrológico e acabou verificando que nos períodos de cheia (julho/90/91) e na vazante (set/90/91) os indivíduos capturados eram frequentemente indivíduos na fase de repouso gonadal e com uma maior quantidade de gordura cavitária, porém, já no período de início da enchente (mar/90/91) houve

uma diminuição da quantidade de gordura cavitária, com a captura de indivíduos imaturos e em repouso. Desta forma, observa-se que no período de início das cheias ocorre uma diminuição da quantidade de gordura cavitária, visto que está ocorrendo a migração dos corimbatás e o amadurecimento das gônadas do mesmo. E Bombardelli (2007), verificou uma estreita relação entre o aumento de energia disponíveis nas rações para reprodutores de tilápia-do-Nilo e o desempenho reprodutivo, ou seja, o aumento de disponibilidade de energia promoveu um aumento na produção de espermatozoides.

Além disso, de acordo com Barbieri (2000), a relação gonadossomática e as frequências absolutas dos estádios de maturação gonadal variam de acordo com as mudanças de temperaturas da água e do ar.

Então, como neste estudo um dos objetivos era verificar a variação do tecido adiposo ao longo do ano, de acordo com as necessidades energéticas dos corimbatás para a realização da Piracema, fez-se necessário à utilização de uma tabela, que nos informa a maturação sexual dos mesmos, como pode ser observada na figura abaixo:

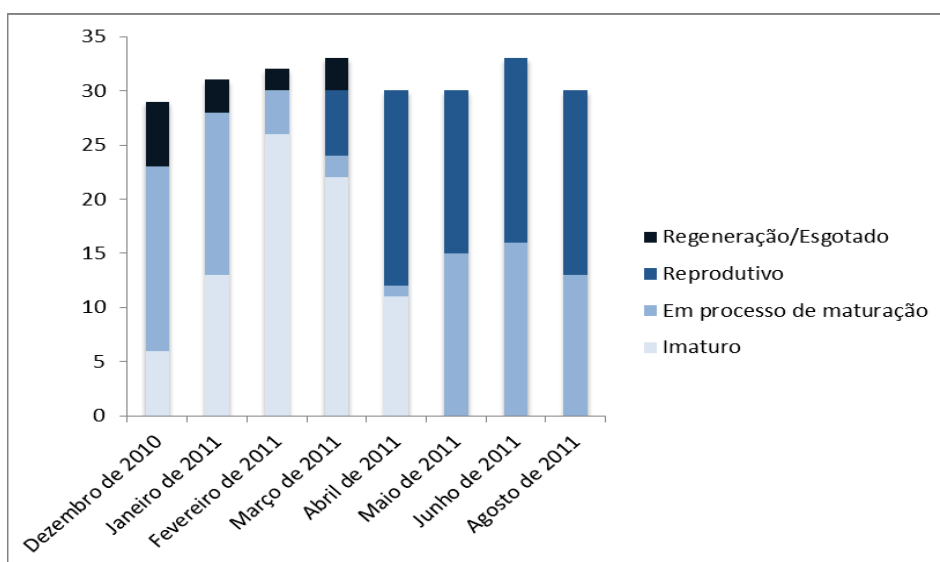


Tabela1: Expõem o grau de maturação dos *Prochilodus lineatus* (corimbatá) capturados mensalmente na região de Topava (corredeira) na Cachoeira da Emas em Mogi-Guaçu. Considerando que o estado em processo de maturação abrange os seguintes estágios: em processo de maturação, parcialmente maduro e maduro; de acordo com a classificação do Laboratório do ICMBio/CEPTA.

Foi possível verificarmos que: no período de maio à janeiro houve uma maior presença de indivíduos em maturação. Desta forma nos períodos de fevereiro à

abril, que coincide com o período de aumento do tamanho dos adipócitos, ocorreram indivíduos imaturos mais frequentemente, podendo sugerir que as reservas energéticas dos adipócitos contribuem para a maturação do indivíduo. Os indivíduos reprodutivos ocorreram mais frequentemente a partir do mês de abril, o que era esperado, visto que o início da Piracema contribui para o recrutamento de indivíduos.

De acordo com as observações de Capeleti (1993), na barragem da Cachoeira de Emas no Rio Mogi-Guaçu-SP, não se verificou a presença de nenhum peixe no local, durante os meses de Junho, Julho e Agosto. Visto que esta barragem serve de rota para os cardumes de curimatás, pode-se concluir que neste período os curimatás permanecem em áreas com abundância de alimento (lares de alimentação), com a finalidade de armazenar reservas de gorduras, que serão utilizadas na migração reprodutiva.

Contudo, não foi o que verificamos, pois tanto tinha peixe no local, quanto que foi caracterizado por uma maior quantidade de curimatás em estado reprodutivo no período de Abril à Agosto. Desta forma, este fenômeno pode ser justificado pela observação de Capeleti (1993) de que a variação dos fatores ambientais de ano pra ano também processam alterações no ritmo migratório.

Além disso, Capeleti (1993) ao verificar um aumento acentuado do número de indivíduos no mês de março e abril, cujo fenômeno seria consequência da chegada de um cardume de corimatá “temporão”, cujos indivíduos apresentavam um comprimento médio inferior e não estavam maduros sexualmente, o que coincide com os dados dos gráficos acima.

De acordo com Godoy (1959 e 1986) o período de setembro a março compreende os principais meses de migração ascendente dos cardumes de grupos heterogêneos de classes de idade, incluindo peixes ainda não maduros, sendo dezembro o mês de maior intensidade dos ritmos migratórios. Contudo, Capeleti (1993) verificaram intensa migração reprodutiva no mês de Outubro, visto que 39,45% dos peixes coletados durante um ano correspondiam ao mês de outubro, sendo assim esses autores acreditam que essas variações do ritmo migratório refletem as alterações físico-químicas pelas quais o Rio Mogi-Guaçu vem passando ao longo dos anos.

Desta forma esperávamos encontrar nos indivíduos adipócitos com grandes reservas energéticas, assim que se aproximasse o período da piracema, bem como sua diminuição ao término deste fenômeno. Este fato aconteceu, porém de uma forma bem discreta, como pode ser verificado nas figuras de 16 a 25, o que permite sugerir, que haja uma variação mais significativa do acúmulo de gordura visceral para o fornecimento de energia, do que propriamente o acúmulo de lipídio em uma única célula, pois quanto maior a superfície de contato maior o transporte de moléculas. Pode-se sugerir, também, que assim como nos atuns a reserva energética de natação pode estar sendo mais acumulada no tecido muscular do que no tecido visceral, o qual pode participar em maior escala do fornecimento de energia para as outras atividades metabólicas, principalmente, reprodutivas.

Kondo *et al.* (2011) ao verificar a distribuição da adiponectina - proteína secretada pelos adipócitos, cuja função é regular o metabolismo de lipídios - pelos diversos tecidos da truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, ele observou uma intensa transcrição da adiponectina no tecido muscular, quando comparado ao tecido adiposo.

Os adipócitos apresentam um tamanho maior quando se compara o mês de junho com o mês de dezembro, por exemplo, quando a piracema já terminou, e com ela o processo reprodutivo. As células apresentam tamanho reduzido, provavelmente decorrente da lipólise (degradação dos lipídios). De forma que estas voltam a aumentar no mês de novembro do ano seguinte, quando ocorre a retomada de todos aqueles processos.

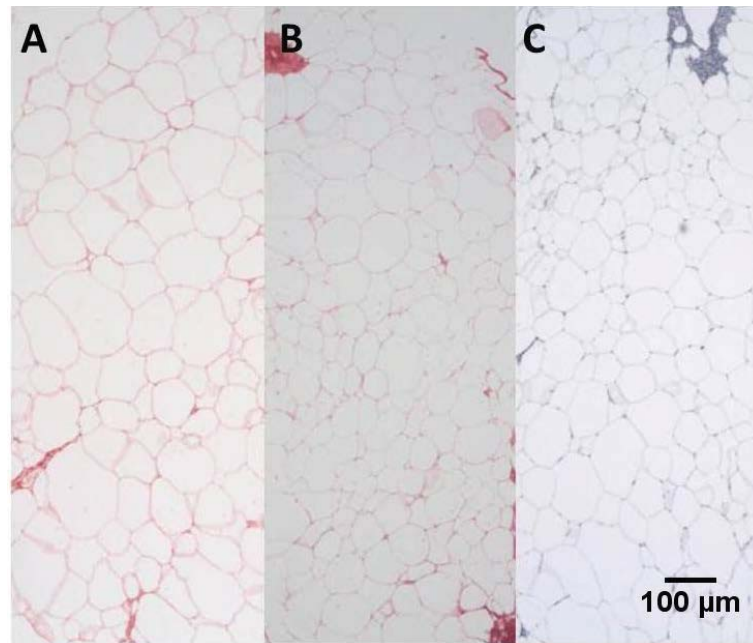


Figura 13: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês dezembro de 2010. A e B – Picrosirrus. C- Azul de Toluidina.

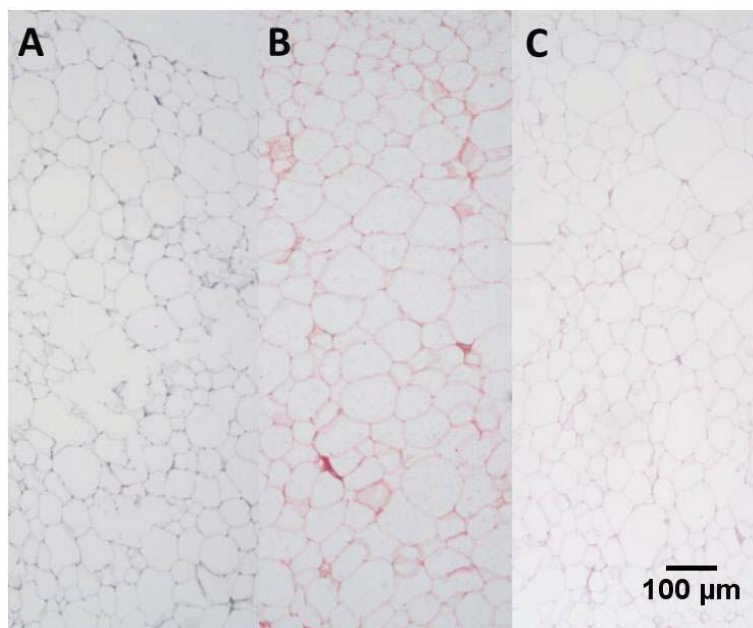


Figura 14: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês janeiro de 2011. A - Azul de Toluidina. B - Picrosirrus. C - HE.

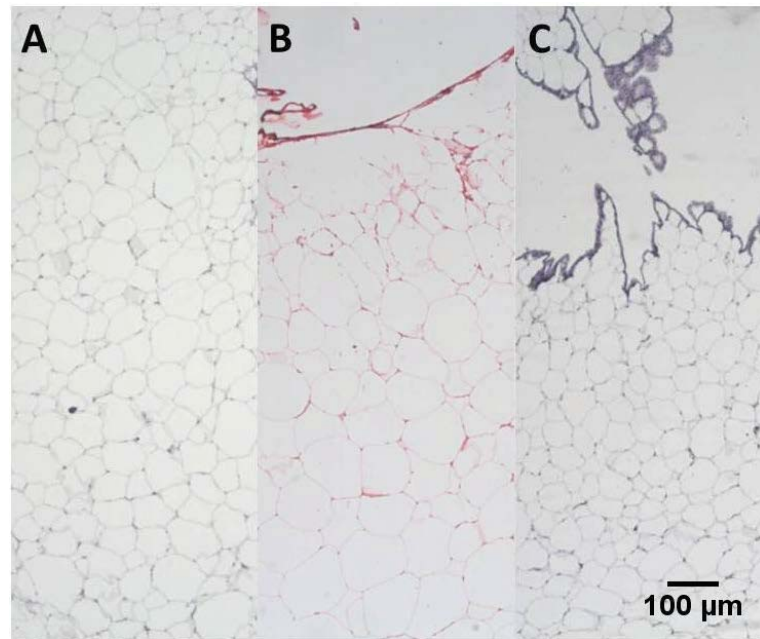


Figura 15: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês fevereiro de 2011. A – HE. B- Picrosirius. C - Azul de Toluidina.

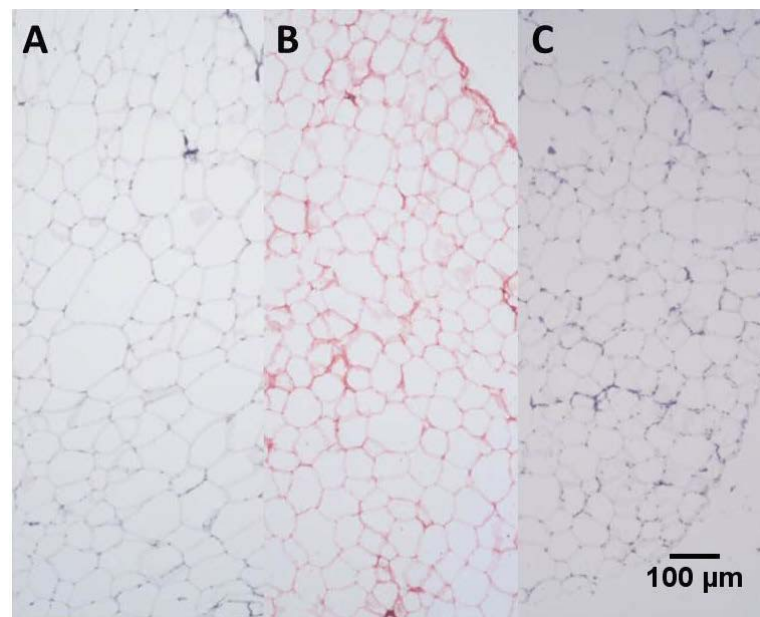


Figura 16: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês março de 2011. A - Azul de Toluidina. B – Picrosirius. C- Azul de Toluidina.

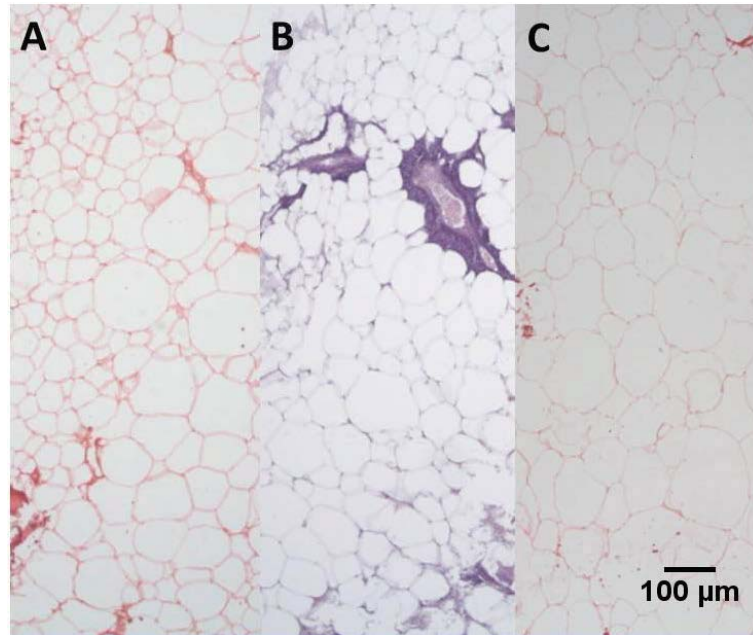


Figura 17: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês abril de 2011. A - Picrosirius. B- Azul de Toluidina. C- Picrosirius.

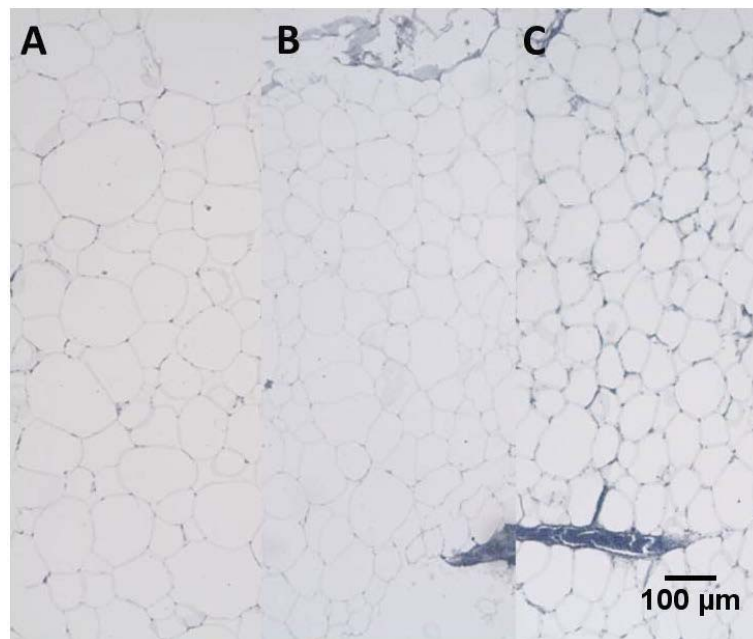


Figura 18: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês maio de 2011. A, B e C - Azul de Toluidina.

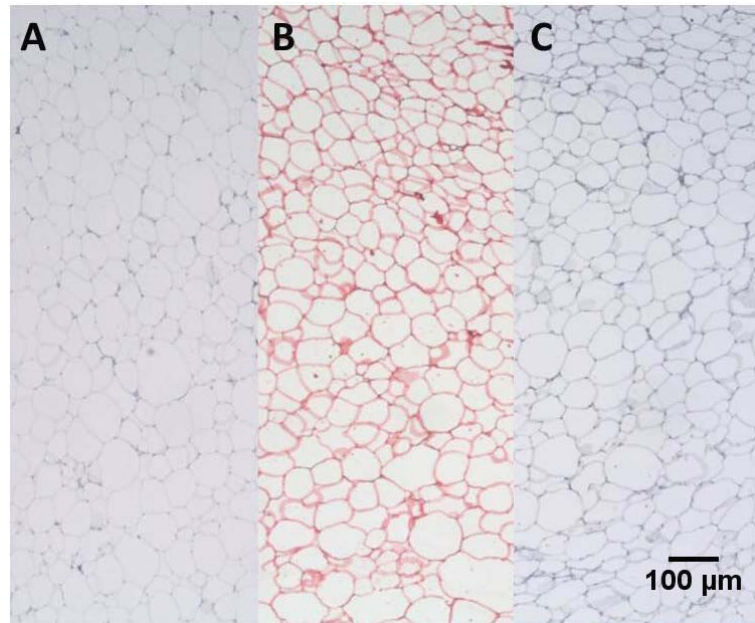


Figura 19: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês junho de 2011. A - HE. B- Picrosirius. C- Azul de Toluidina.

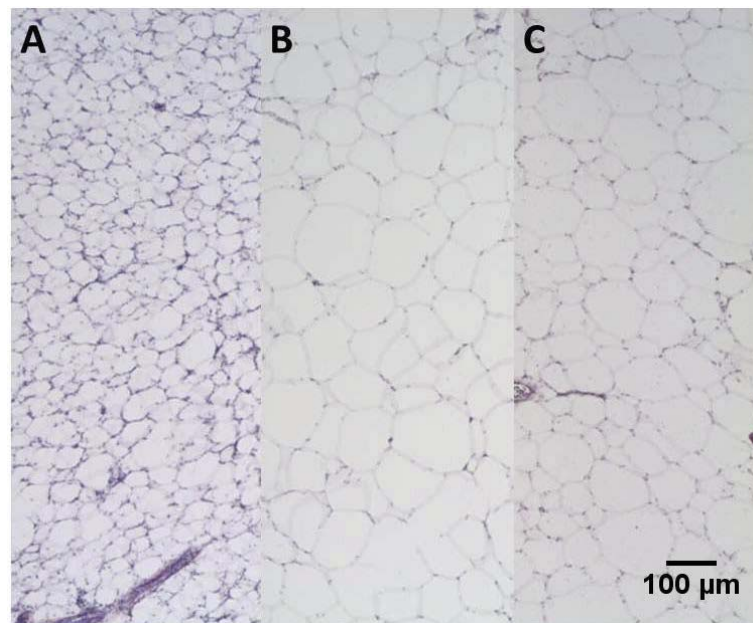


Figura 20: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês agosto de 2011. A, B e C - Azul de Toluidina.

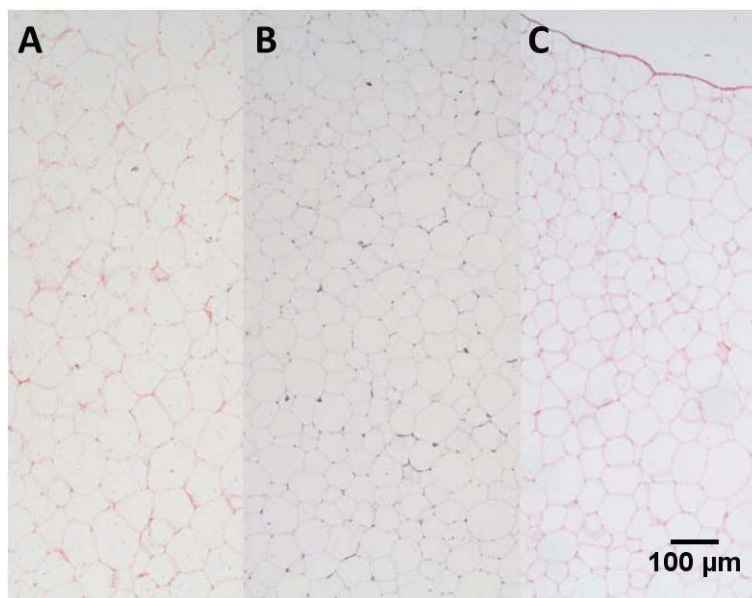


Figura 21: Secção histológica de tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês outubro de 2011. A – Picrosirius. B - Azul de Toluidina. C – Picrosirius.

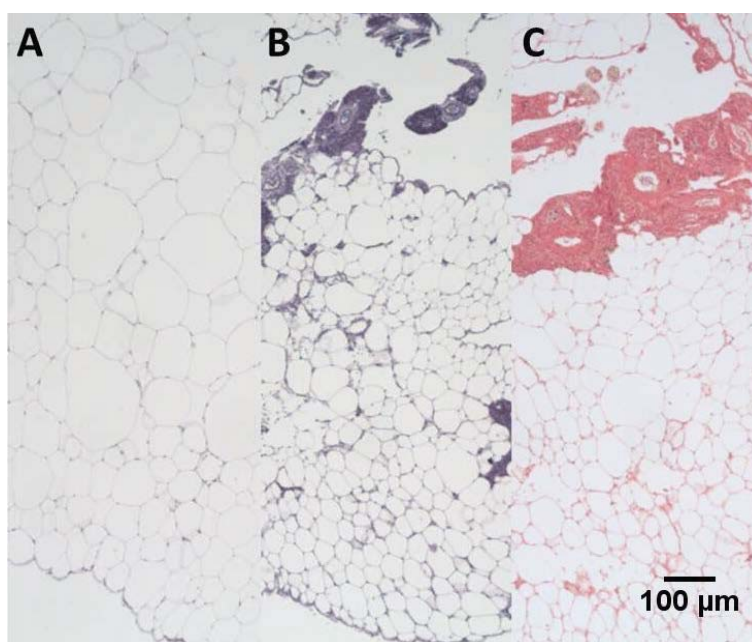


Figura 22: Secção histológica mostrando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês novembro de 2011. A - HE. B - Azul de Toluidina. C- Picrosirius.

Capeleti (1993) observou uma variação nos parâmetro de crescimento de acordo com o sexo, e como tal foi possível verificar que as células adiposas dos machos mostraram-se maiores que as das fêmeas (Figuras 23 a 26). Tal fato fica sem explicação quando se considera que as fêmeas são responsáveis pela produção do ovócito rico em nutrientes e de acordo com Rios *et al* (2011) o produto

de degradação dos lipídios não é todo canalizado às vias oxidativas, pois uma parte contribui na constituição dos ovócitos em desenvolvimento, alguns deles mediados pela biossíntese hepática de vitelogenina, esperava-se encontrar adipócitos maiores nas fêmeas, garantindo uma maior reserva energética. Entretanto podemos conjecturar que isto se deve ao fato de que a redução do aumento do volume do tecido adiposo deve ser devido ao fato das reservas serem prontamente utilizadas para a elaboração dos ovócitos e assim propiciar o crescimento dos ovários.

Esse aumento excessivo do tecido adiposo nas fêmeas, além de comprometer a função dos demais órgãos abdominais (pela redução do espaço) prejudicaria o desenvolvimento dos ovários e consequentemente implicaria na dificuldade de locomoção devido ao grande aumento de volume do tecido e do órgão em questão. Assim sendo as reservas tão logo fossem acumuladas seriam mobilizadas para outros locais, como a produção de vitelo.

Além do que, de acordo com Garcia (2002), a partir da análise do tecido adiposo de ratos em jejum, através da microscopia óptica observou-se que conforme a mobilização de lipídios, as células adiposas uniloculares tornaram-se multiloculares, com a redução do diâmetro. Desta forma, podemos sugerir que o fato de as fêmeas apresentarem células menores está relacionado: ou ao aumento da superfície, visto que quanto menor o volume maior a área superficial, ou seja, pode estar associado a uma forma mais rápida de difusão do lipídio pela membrana celular para os capilares sanguíneos em direção aos ovários; ou ao fato de nem haver a formação de tecido de reserva, mas sim seu direto consumo devido ao grande gasto energético.

Machado (2007) em seu estudo com *P. lineatus* verificou uma semelhança tanto na forma quanto no tamanho nos cardumes de estoques migradores, ou seja, estes não apresentaram diferenças morfológicas entre si. Porém, este autor verificou que as fêmeas apresentaram crescimento maior, quanto às medidas aritméticas desses caracteres, que o dos machos, visto que elas possuem gônadas maiores e um maior gasto energético para efetivação da reprodução, sendo necessárias proporções corporais maiores.

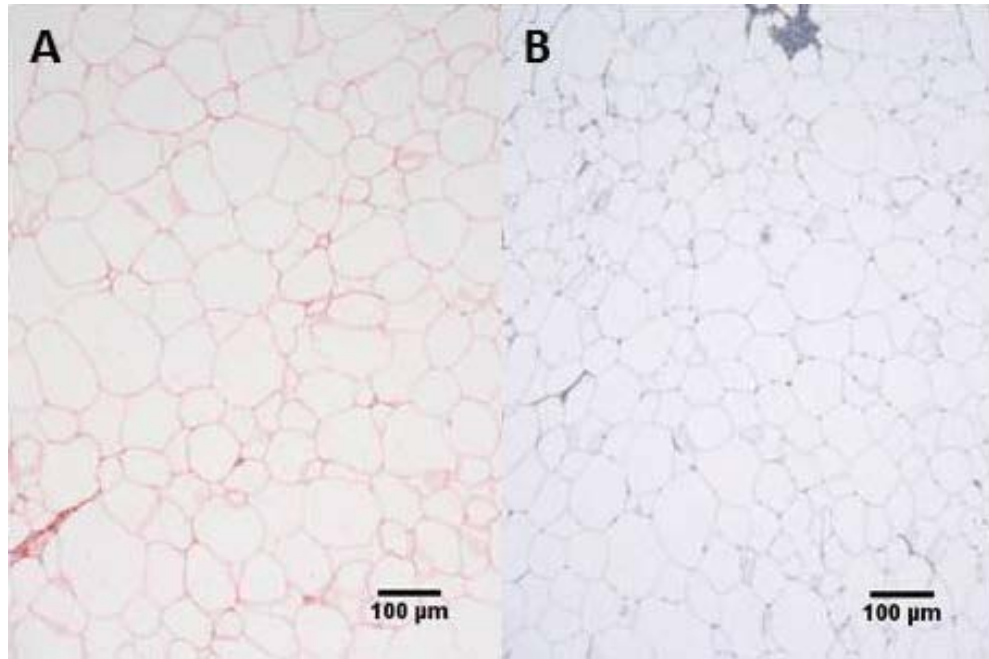


Figura 23: Secção histológica comparando tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês dezembro de 2010. **A:** tecido adiposo de um macho. Picrosirius. **B:** tecido adiposo de fêmea. HE.

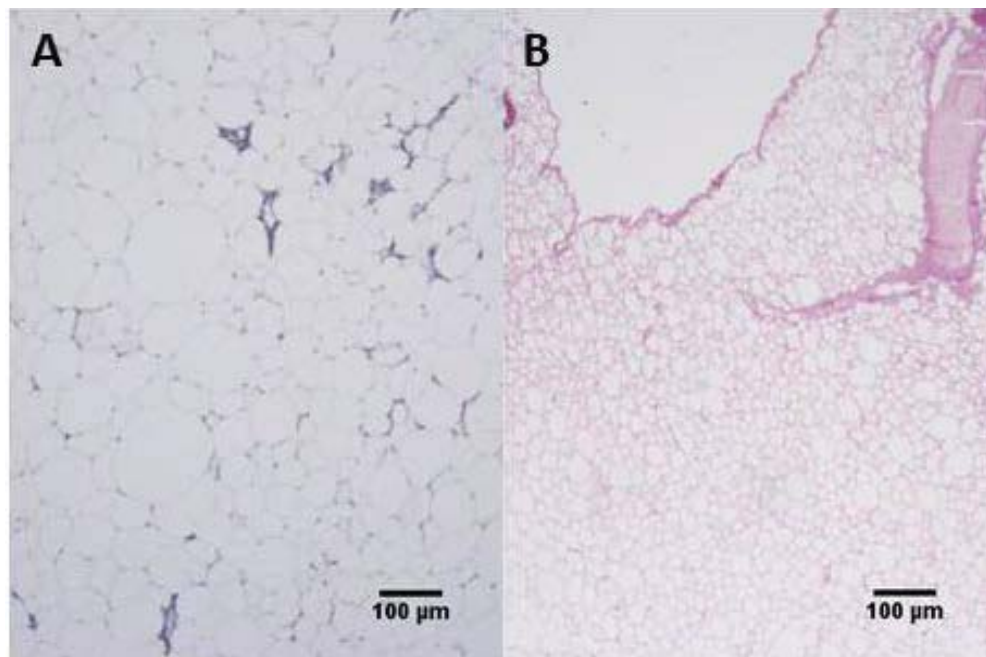


Figura 24: Secção histológica comparando tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês abril de 2011. **A:** tecido adiposo de macho. HE. **B:** tecido adiposo de fêmea. PAS.

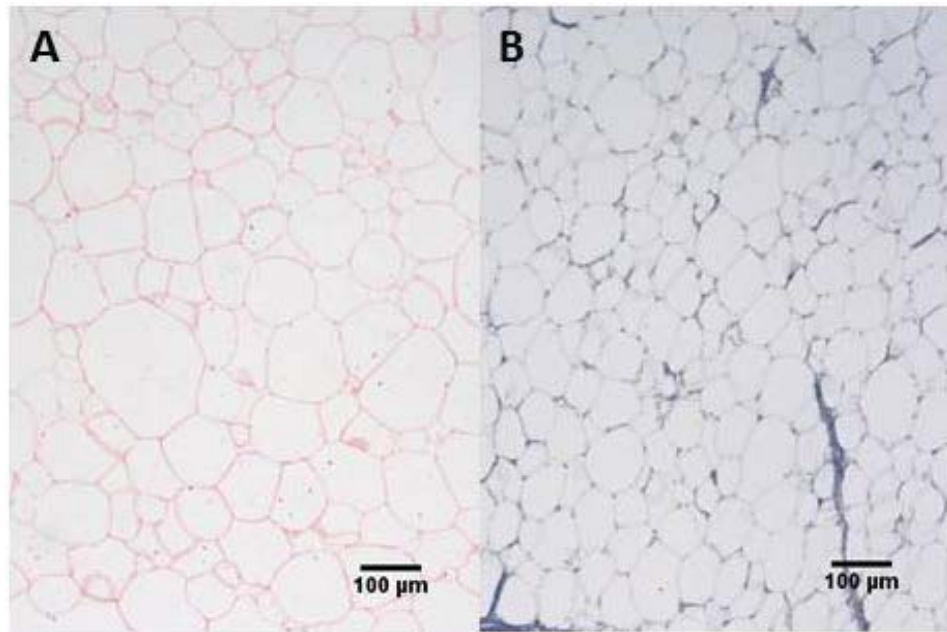


Figura 25: Secção histológica comparando tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês maio de 2011. **A:** tecido adiposo de macho. Picrosirius. **B:** tecido adiposo de fêmea. Azul de Toluidina.

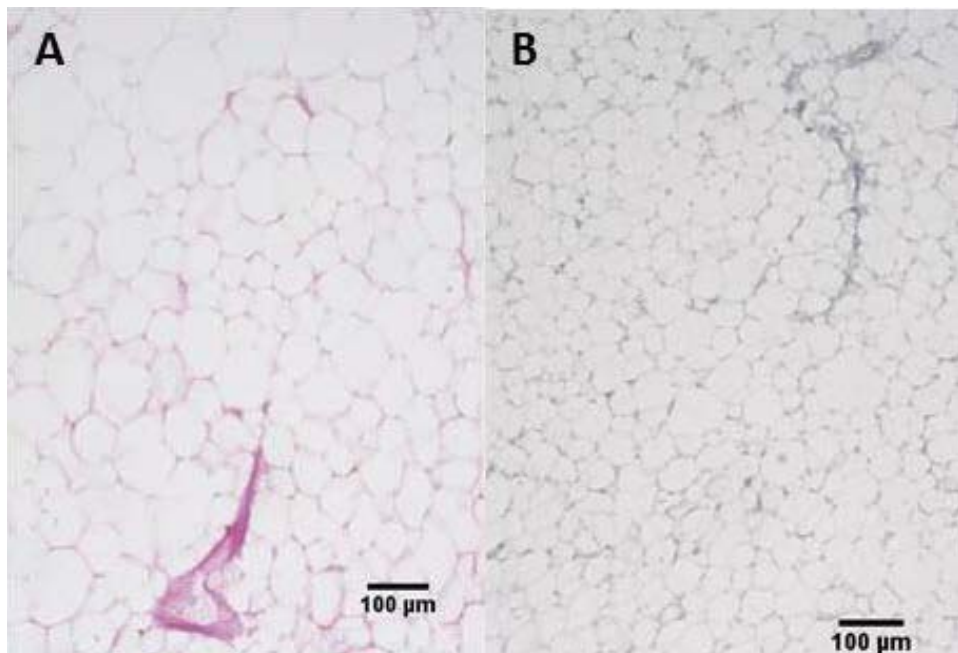


Figura 26: Secção histológica comparando tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês agosto de 2011. **A:** tecido adiposo de macho. PAS. **B:** tecido adiposo de fêmea. Azul de Toluidina.

Nas lâminas tratadas com Azul de Toluidina é possível observar os núcleos dos adipócitos, (figuras de 27 e 28). Além disso, pode-se verificar a ausência de reação na região citoplasmática, devido à remoção lipídico (GENESER, 2003) e do conteúdo citoplasmático. Nada consta na literatura que provocasse maiores discussões.

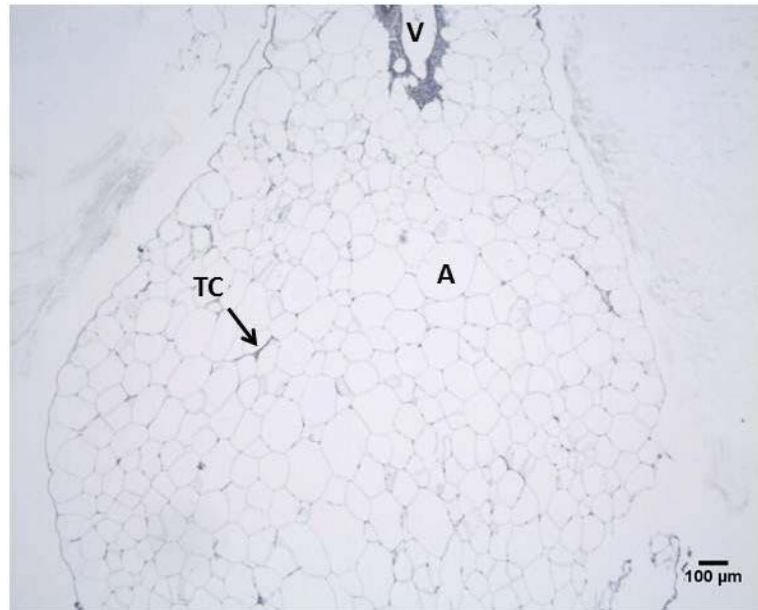


Figura 27: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês dezembro de 2010 – Azul de Toluidina.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; H = hemácias TC= tecido conjuntivo.

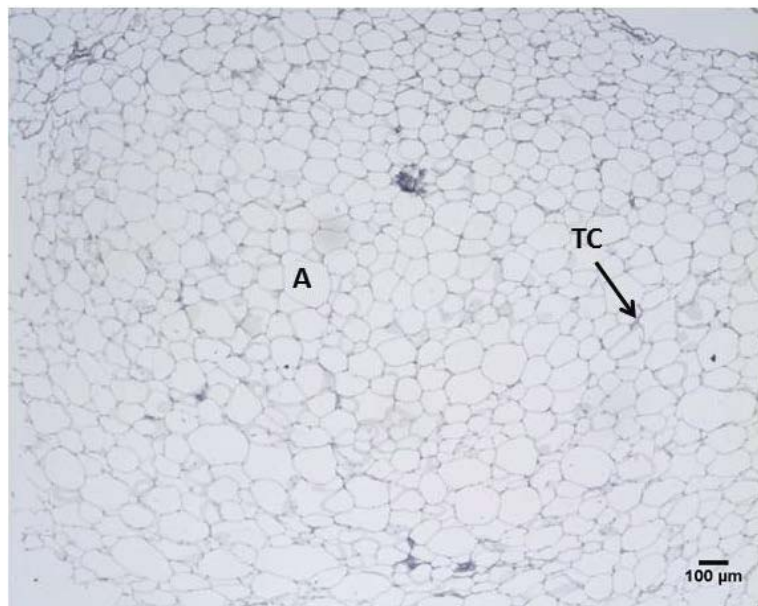


Figura 28: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês junho de 2011 – Azul de Toluidina.

A= adipócitos; TC= tecido conjuntivo.

Nas figuras de 29 à 34 (material tratado com picrossirus para colágenos) nota-se que somente os compostos extracelulares reagiram ao tratamento (região citoplasmática e tecido conjuntivo). Neste procedimento o que ficou evidente é que o arcabouço que sustenta o conjunto de células adiposas é constituído por material rico em colágeno, evidenciado pela forte reação positiva (vermelho).

De fato, segundo Issa *et al.* (2009) o colágeno é a classe de proteína fibrosa mais representativa da matriz extracelular e tecido conjuntivo, o que explica porque todo este tecido foi marcado para a técnica para colágeno no presente trabalho. Ainda segundo este autor, o colágeno é responsável pela estrutura inicial e conformação estrutural dos tecidos, função esta bem conhecida do tecido conjuntivo.

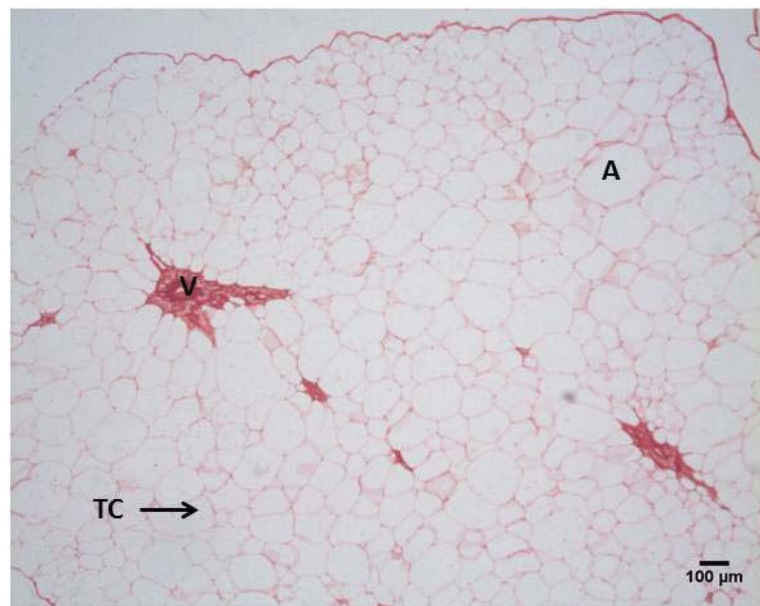


Figura 29: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês jameiro de 2011 – Picrosirius.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

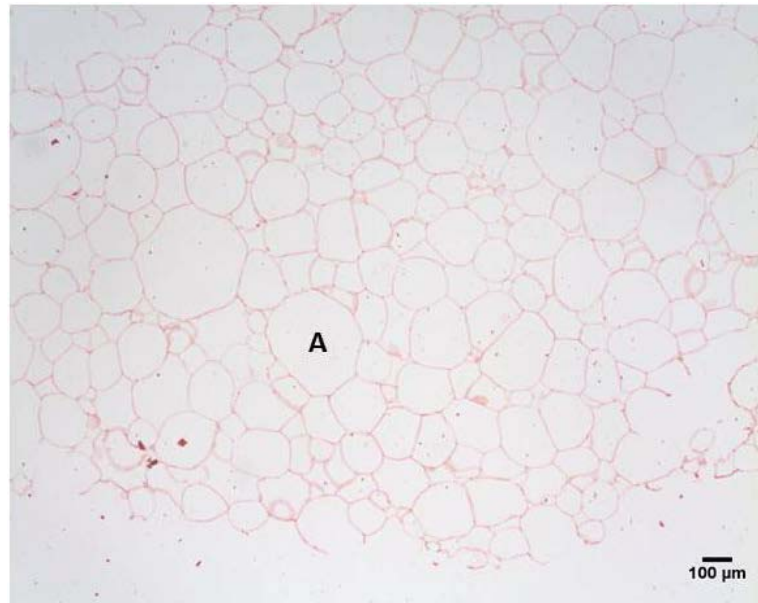


Figura 30: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês maio de 2011 – Picrosirius.

A= adipócitos.

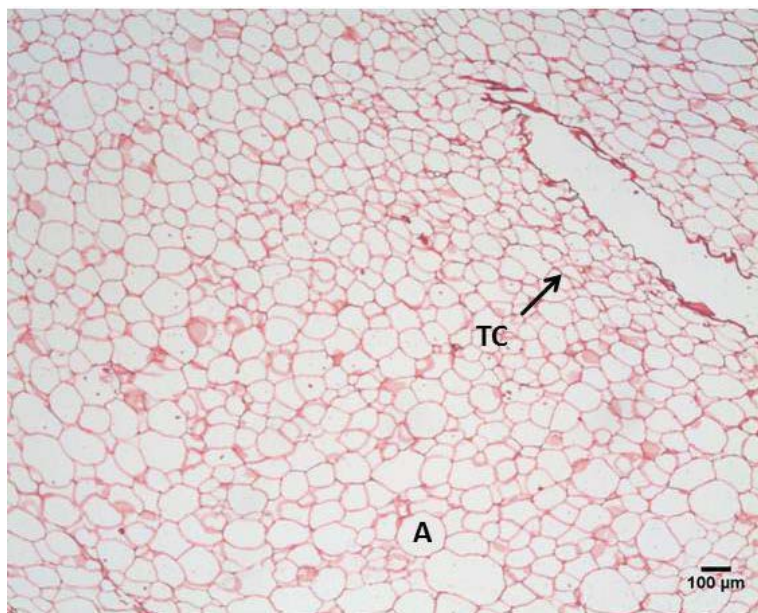


Figura 31: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês junho de 2011 – Picrosirius.

A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

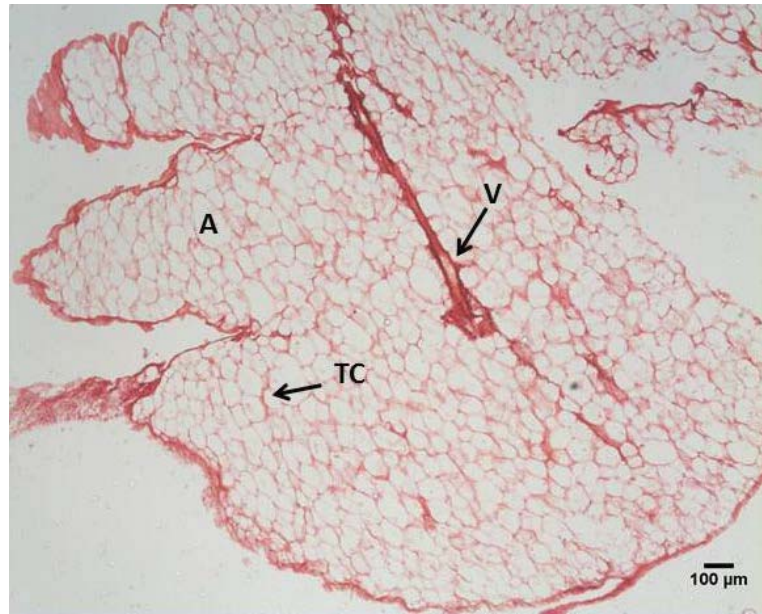


Figura 32: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês agosto de 2011 – Picosirius.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

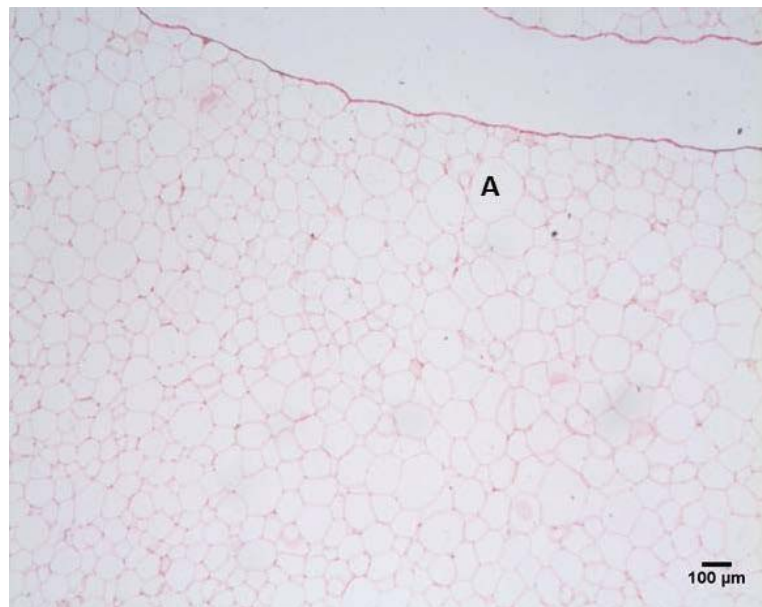


Figura 33: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês outubro de 2011 – Picosirius.

A= adipócitos.

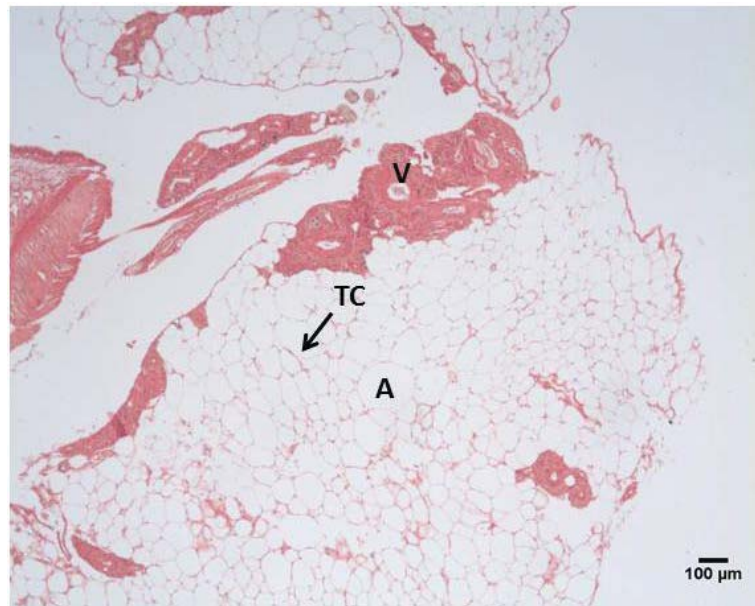


Figura 34: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês novembro de 2011 – Picrosirius.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos ; TC= tecido conjuntivo.

As lâminas tratadas com a técnica do PAS (Ácido Periódico de Schiff) foram devidamente coradas, indicando a presença de polissacarídeos neutros em todo o arcabouço das células adiposas. Como se pode verificar nas figuras de 35 a 37.

As figuras mostram que no mês de dezembro (Figura 35) a reação foi nitidamente mais forte do que aquela observada no material do mês de janeiro (Figura 37), o que sugere a mobilização destes recursos no período maior da vida dos organismos vivos que é o da reprodução.

Smith (1950) encontrou altas concentrações de açúcar no sangue do sapo comum (*Rana temporaria*) associadas à atividade sexual, concentrações estas que caíram logo após desova. De maneira que se confirma a mobilização destes recursos após a piracema inferida a partir dos resultados do presente trabalho.

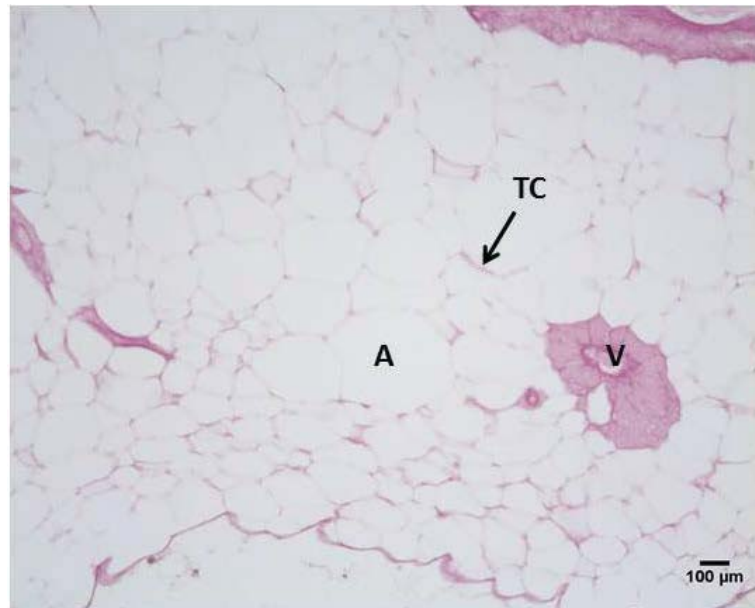


Figura 35: Secção histológica do tecido adiposo de *P. lineatus* (curimatá) coletado no mês dezembro de 2010. Observe que a região citoplasmática não apresentou qualquer reação ao teste, porém a membrana plasmática sim, bem como as células que rodeiam os vasos sanguíneos – PAS.
V=vaso sanguíneo; A= adipócitos; TC= tecido conjuntivo

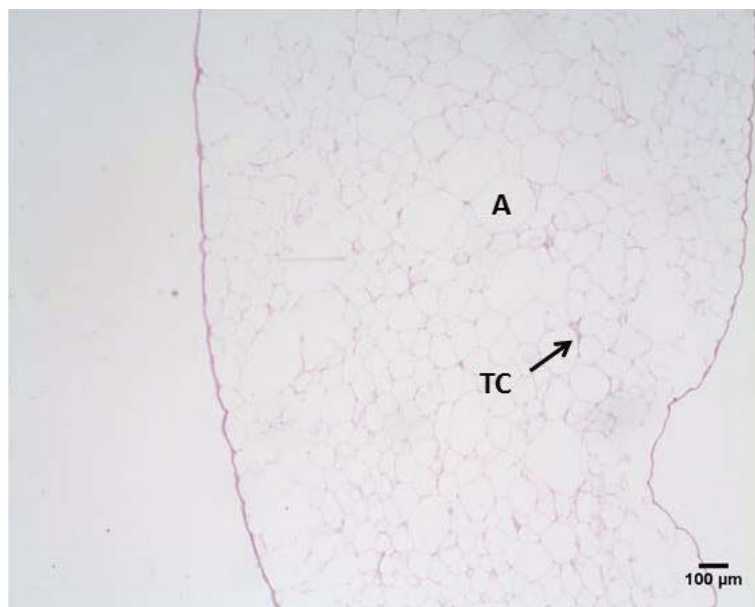


Figura 36: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimatá) coletado no mês janeiro de 2011 – PAS.

A= adipócitos; TC= tecido conjuntivo.

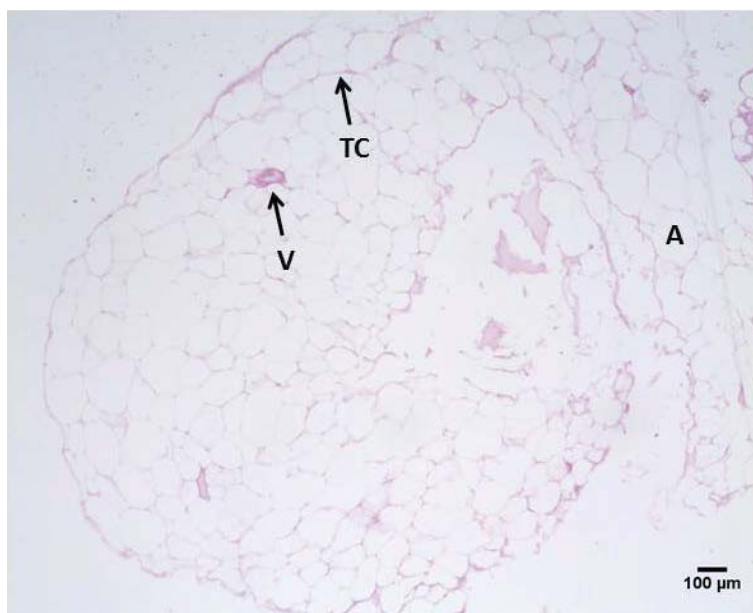


Figura 37: Figura de tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no mês maio de 2011 – PAS.

V=vaso sanguíneo; A= adipócitos; TC= tecido conjuntivo.

6.3. Análises do tecido dos corimbatás expostos a diferentes tratamentos

Nesta terceira parte do projeto, as lâminas obtidas foram de indivíduos expostos a uma solução de detergente e outras de indivíduos mantidos em água pura (controle), assim foram realizadas duas coletas uma no primeiro semestre e outra no segundo semestre. As lâminas obtidas a partir da coleta do primeiro semestre apresentaram sutis diferenças entre os adipócitos dos indivíduos mantidos em água pura e dos expostos ao detergente, como é possível observar nas figuras de 38 a 56, ou seja, os adipócitos dos indivíduos expostos ao detergente são menores que os do grupo controle.

De acordo com os estudos de Hektoen (1992), os locais de deposição do 2,3,7,8 tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) no bacalhau foram o fígado e o sistema nervoso, enquanto que na truta arco-íris essa deposição ocorreu em seus tecidos gordurosos visceral e extravisceral. Desta forma Hektoen (1992) ao considerar que os reservatórios de lipídios no bacalhau ocorrem principalmente no fígado e que esse poluente organoclorado possui um alto grau de lipoficidade; verificou que os locais de predileção do 2,3,7,8 TCDD são tecidos ricos em lipídios.

Segundo Letcher *et al.* (2002) os peixes que possuem mudanças temporais em bioenergética, ou seja, períodos de deposição e mobilização lipídica, tornam este tecido mais sensível aos poluentes orgânicos persistentes, classificados como contaminantes orgânicos halogenados, pois podem prejudicar a atividade biológica dos indivíduos em períodos de déficit energético, visto que o lipídio ocupa a maior parte do citoplasma celular, local de concentração desses poluentes.

Sendo assim, considerando que o detergente possui uma característica anfipática e que de *P.lineatus* possui períodos de intensa acumulação e mobilização de lipídios, pode-se afirmar que a alteração morfológica do tecido adiposo do Grupo do Detergente é consequência da exposição dos indivíduos a este poluente, assim como observado na figura abaixo ao comparar o tecido do indivíduo do grupo controle e do grupo exposto ao detergente.

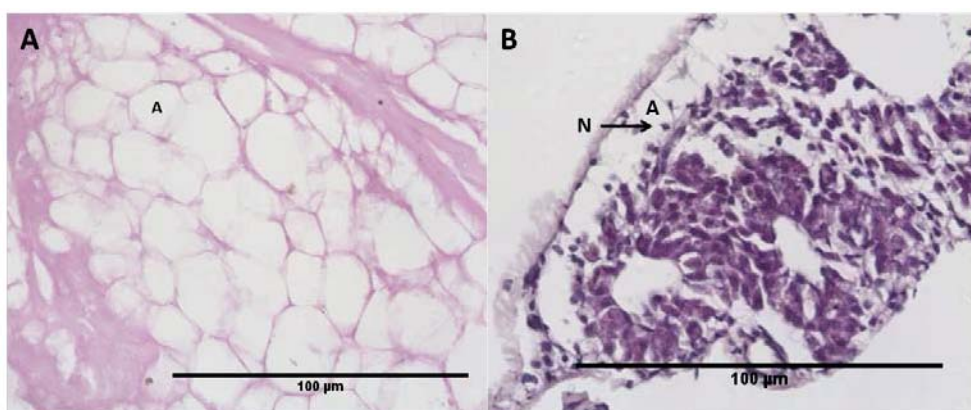


Figura 38: Secção histológica comparando o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) coletado no segundo semestre de 2011. **A:** tecido adiposo de indivíduo do Grupo Controle. PAS. **B:** tecido adiposo de um indivíduo do Grupo do Detergente.

A= adipócitos ; N= núcleo.

Além disso, Wang *et al.* (2009), verificaram que pesticidas, metais pesados, mutagênicos químicos, e vários fatores de estresse pode causar um aumento de radicais livres e o estresse oxidativo, e podem causar sérios prejuízos à célula, como por exemplo, peroxidação lipídica, desnaturação de proteínas e DNA. Desta forma pode-se inferir que a redução do tamanho adipócito pode estar relacionada à peroxidação lipídica, cujo evento bioquímico ocorre em cascata, provocando a desestruturação da membrana plasmática, bem como a perda de sua seletividade.

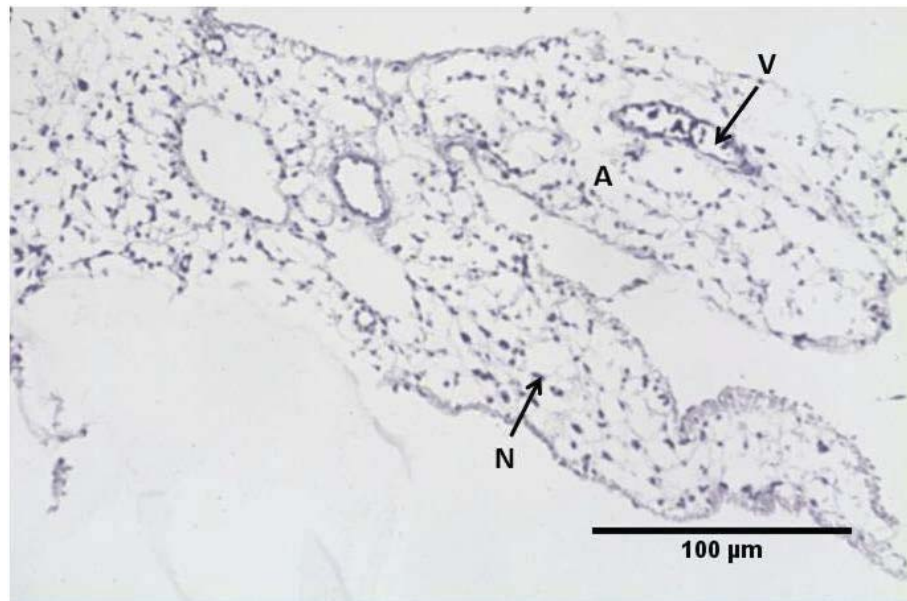


Figura 39: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da primeira coleta. HE.

A= adipócitos ; N= núcleo; V= vaso sanguíneo

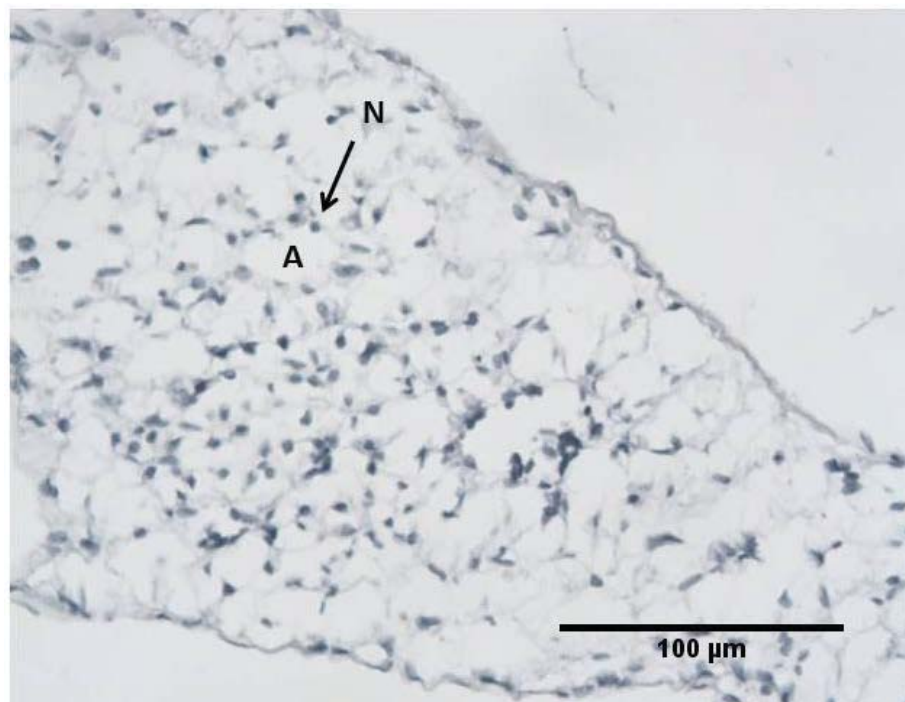


Figura 40: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da primeira coleta. Azul de Toluidina.

A= adipócitos ; N= núcleo.

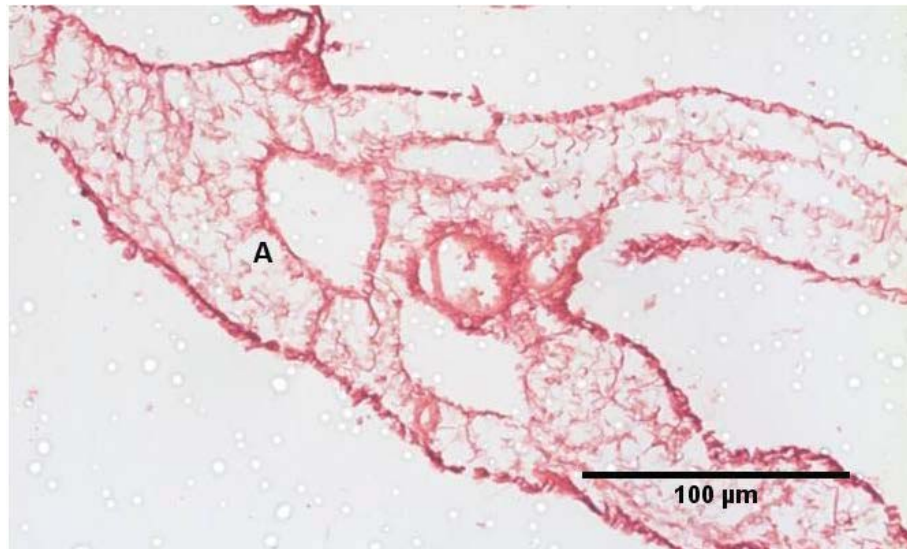


Figura 41: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da primeira coleta. Picrosirius.

A= adipócitos

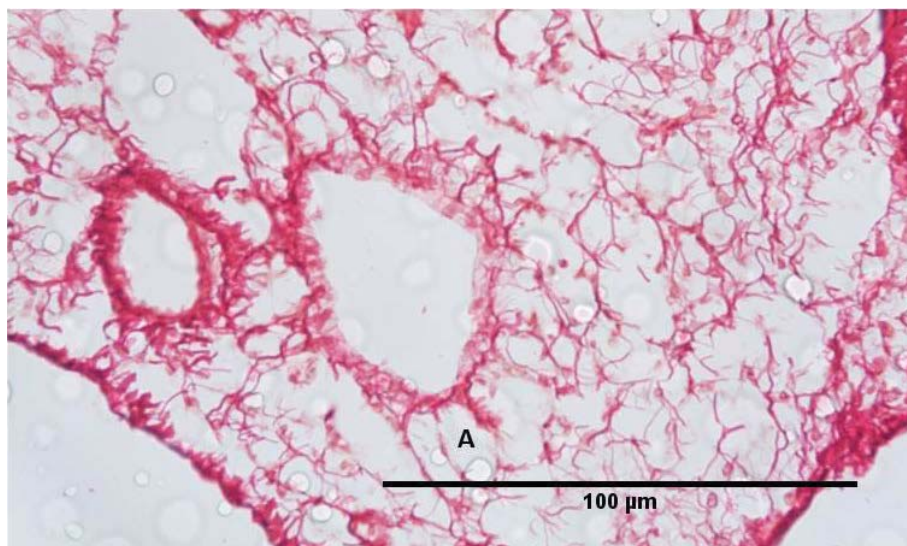


Figura 42: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da primeira coleta. Picrosirius.

A= adipócitos

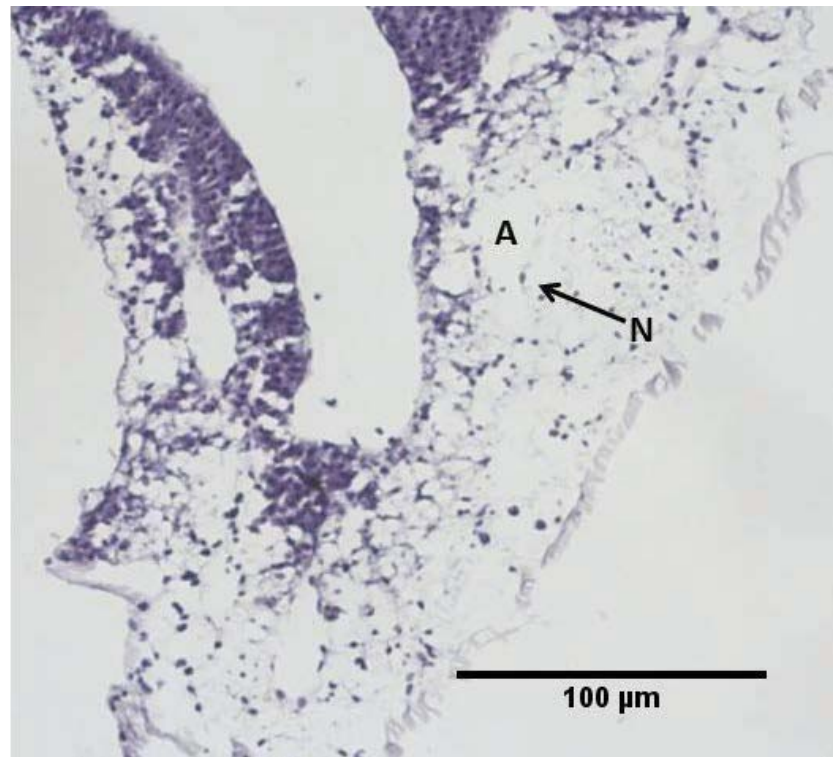


Figura 43: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da primeira coleta. HE.

A= adipócitos ; N= núcleo

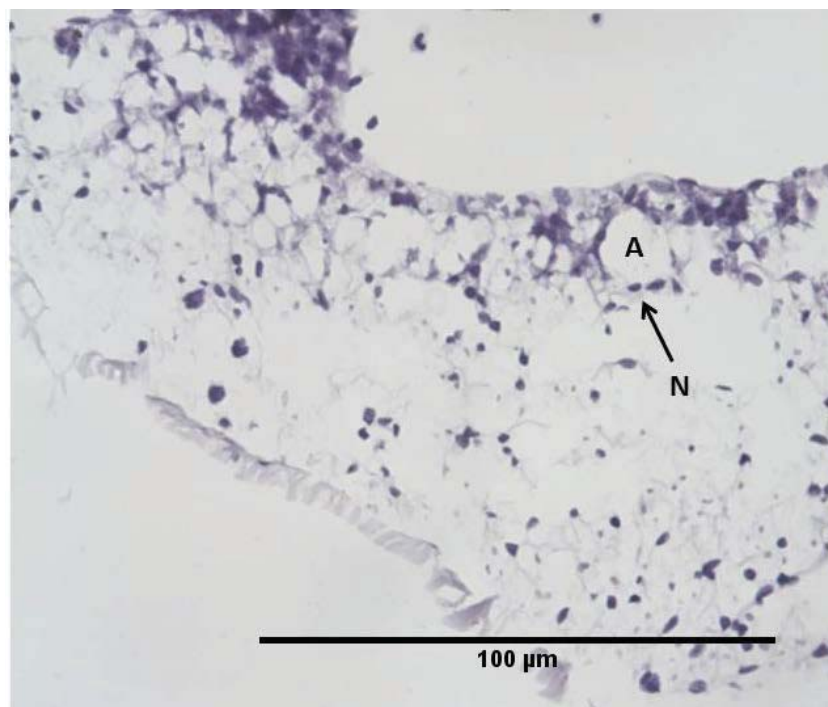


Figura 44: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da primeira coleta. HE.

A= adipócitos ; N= núcleo

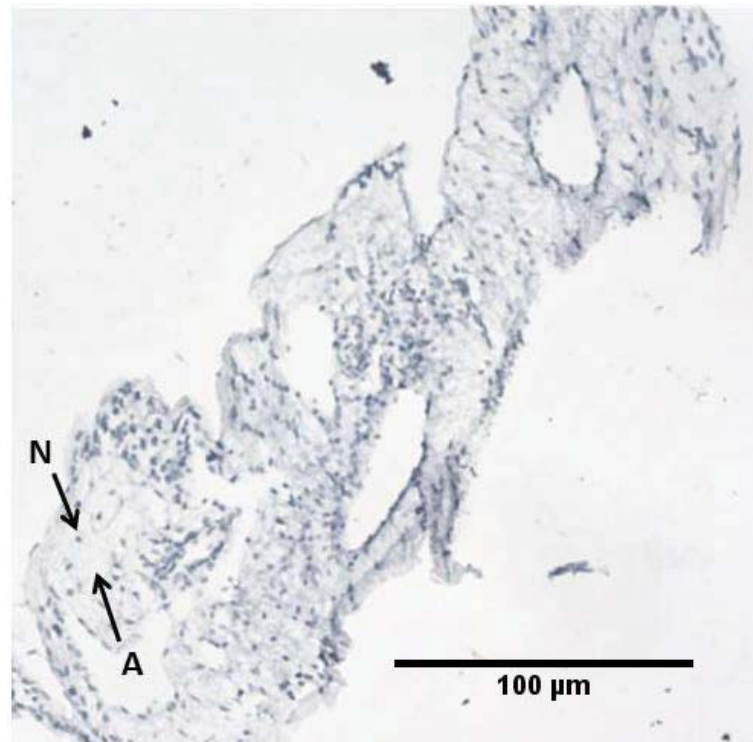


Figura 45: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da primeira coleta. Azul de Toluidina.

A= adipócitos ; N= núcleo



Figura 46: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da primeira coleta. Azul de Toluidina.

A= adipócitos ; N= núcleo.

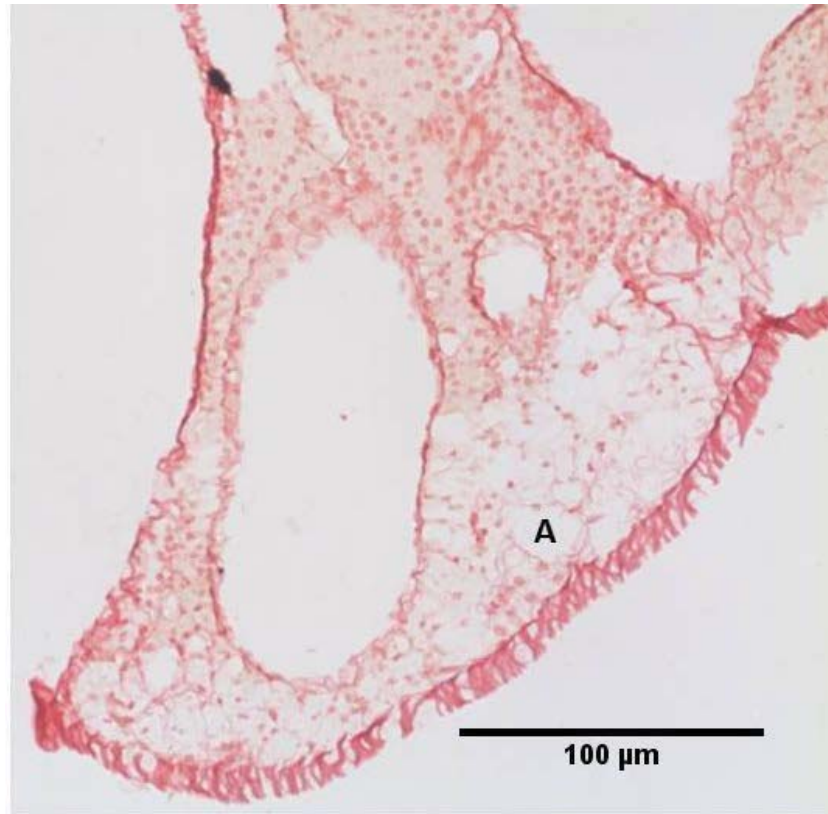


Figura 47: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da primeira coleta. Picrosirius.

A= adipócitos.

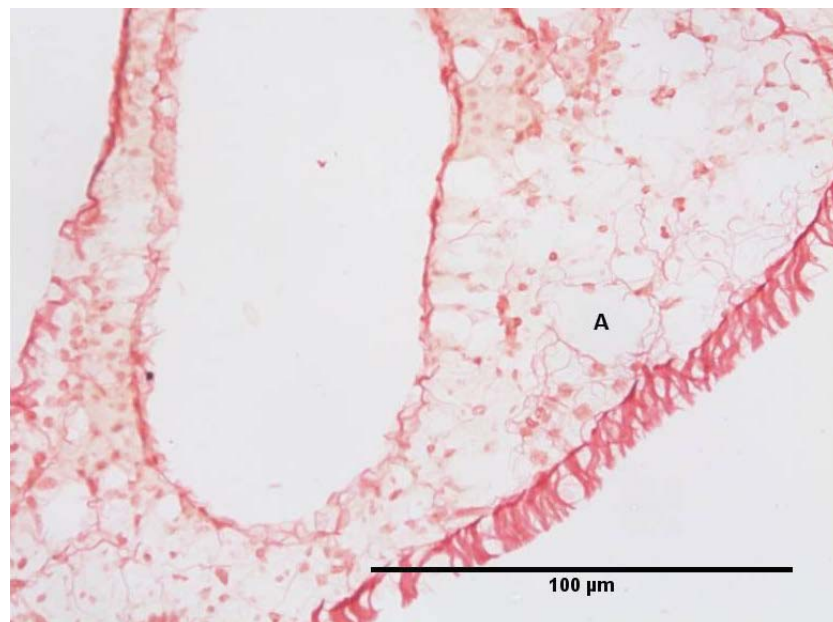


Figura 48: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da primeira coleta. Picrosirius.

A= adipócitos ; N= núcleo.

Sendo assim, nas lâminas obtidas a partir da coleta do segundo semestre a diferença entre os adipócitos dos dois grupos, citada anteriormente, acentuou-se, de forma que é possível observar nas figuras de 49 a 52, os adipócitos do grupo controle mais desenvolvidos quando comparados aos adipócitos dos expostos ao detergente das figuras 53 a 56. O que deve ser explicado pelo mesmo fenômeno já discutido e confirmado por outros autores (Hektoen, 1992; Letcher *et al.*, 2002).

Wang *et al.* (2011) estudou os efeitos de diversos pesticidas sobre o tecido adiposo de humanos, caracterizado como um biomarcador, afim de avaliar a extensão da exposição dos mesmos. Assim como no presente estudo, esse autor verificou uma estreita interação entre o tecido adiposo e o meio ambiente, visto que altos níveis de DDT e HCH foram encontrados no tecido adiposo humano em indivíduos expostos a três diferentes regiões da China, de forma que as amostras das regiões com intensa utilização dos pesticidas, Nantong e Hexian, por serem regiões agrícolas, apresentaram maior deposição dos organoclorados, enquanto que as amostras da outra região, Dachang, por ser uma área industrial, foi a que apresentou menor acúmulo desses pesticidas. Além disso, ele associou a mortalidade dos indivíduos provocada por tumores malignos com essa exposição, percebendo que os incidentes de tumores malignos variaram, nessas três regiões, da mesma forma que o pesticida no tecido adiposo humano.

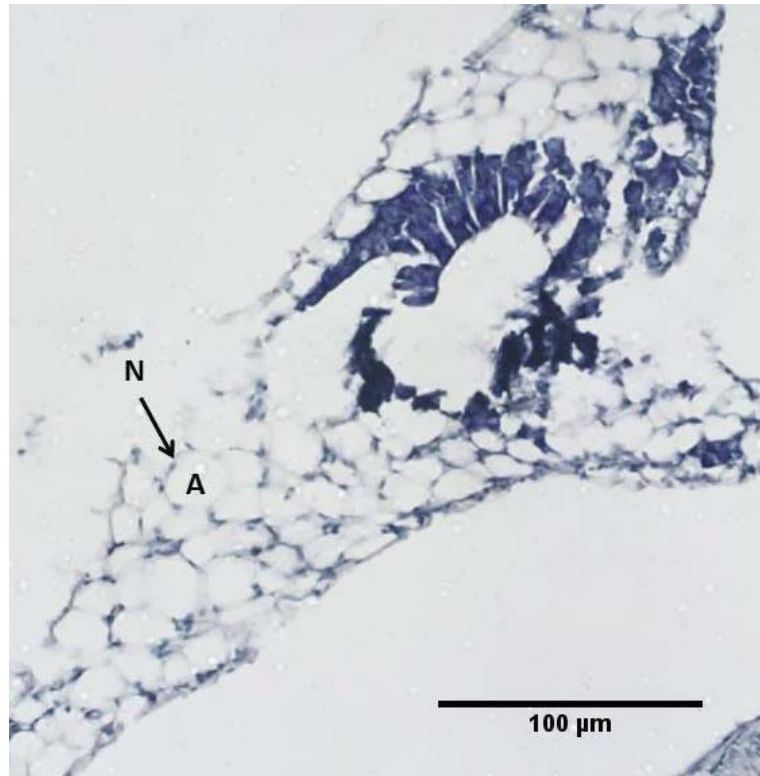


Figura 49: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da segunda coleta. Azul de Toluidina.

A= adipócitos ; N= núcleo

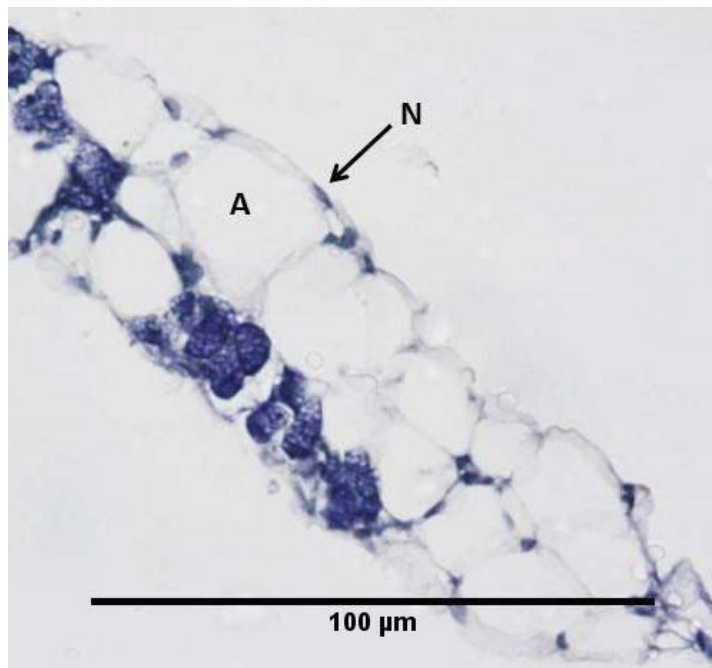


Figura 50: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da segunda coleta. Azul de Toluidina.

A= adipócitos ; N= núcleo

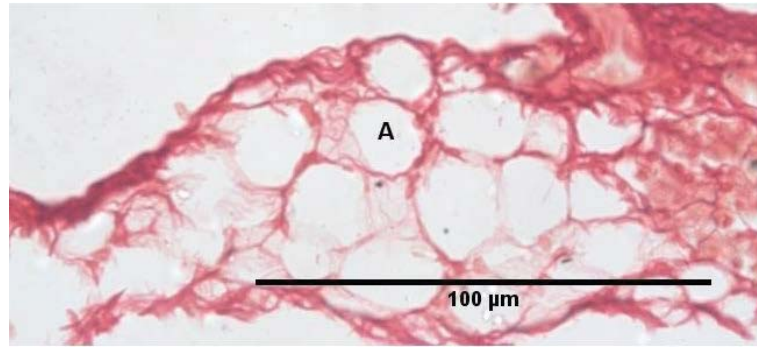


Figura 51: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da segunda coleta. Picrosirius.

A= adipócitos

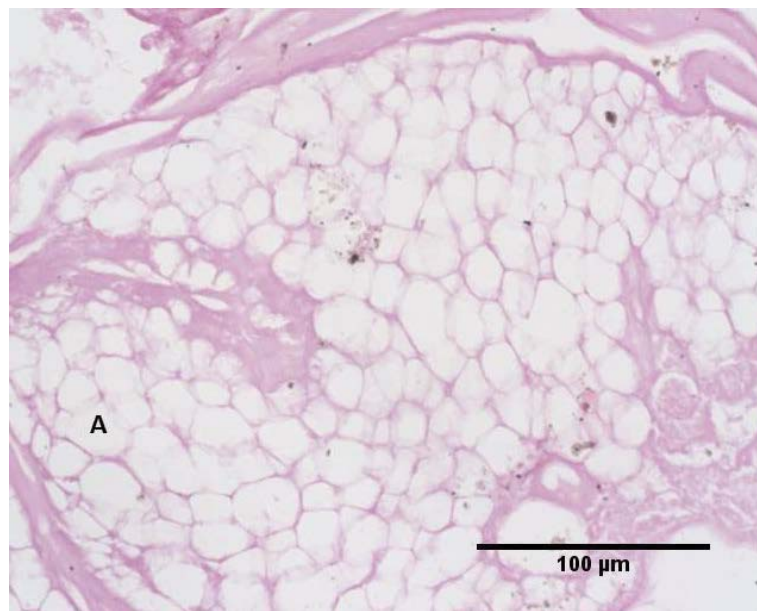


Figura 52: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo Controle da segunda coleta. PAS.

A= adipócitos



Figura 53: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da segunda coleta. HE.

A= adipócitos ; N= núcleo

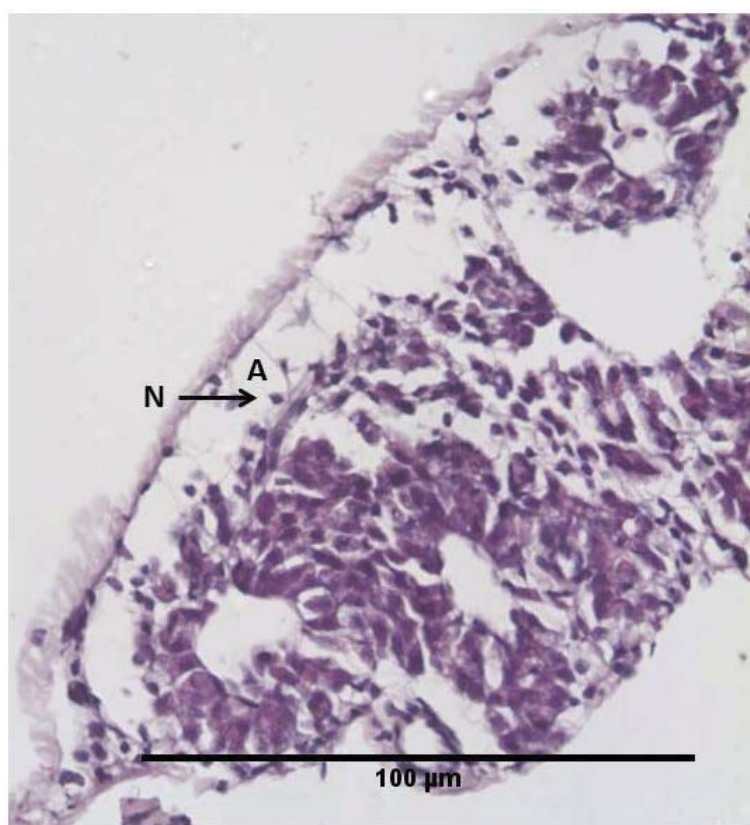


Figura 54: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da segunda coleta. HE.

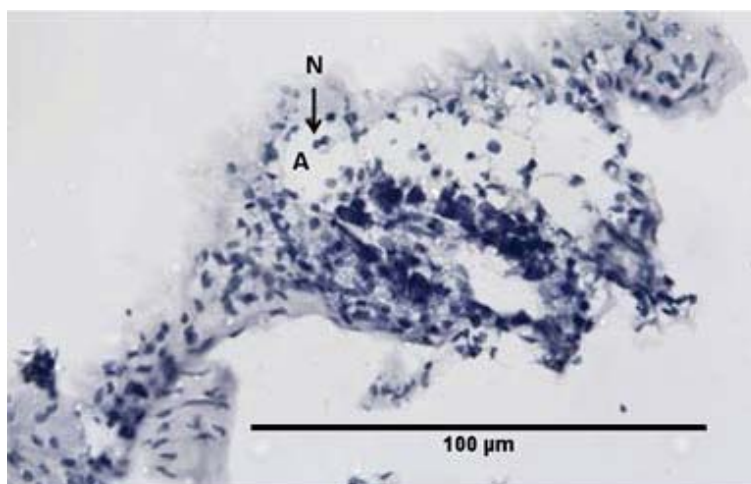


Figura 55: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da segunda coleta. Azul de Toluidina.

A= adipócitos ; N= núcleo

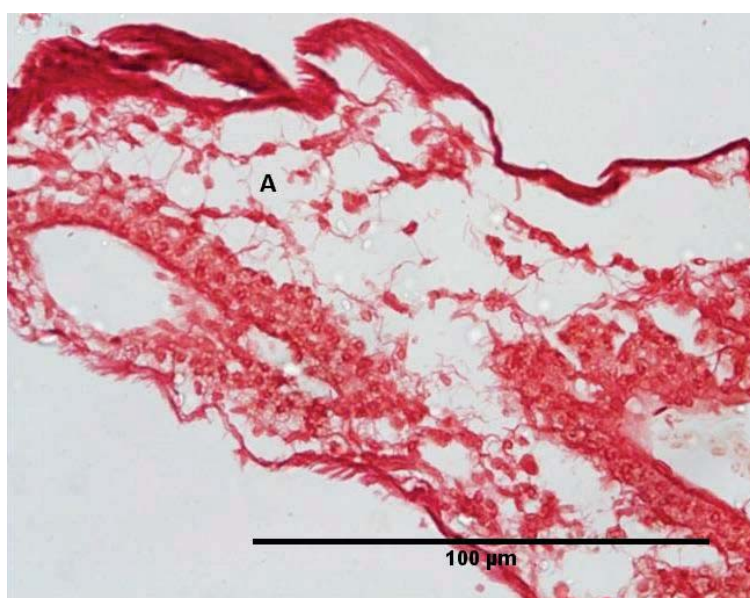


Figura 56: Secção histológica do tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (corimbatá) – Grupo exposto ao Detergente da segunda coleta. Picrosirius.

A= adipócitos ; N= núcleo.

Portanto, a importância deste estudo consiste de duas vertentes tanto pelo fato de essa espécie ser um importante fator de bioindicador, contribuindo para a verificação da poluição da natureza; como também pelo fato de constituir um caso de saúde pública, visto que está é um peixe de alta comercialização e consumo, cujos parâmetros dependem de sua textura e composição química de sua carne (MACHADO, 2007).

Além disso, segundo Capeleti (1993) o rio Mogi-Guaçu vem sofrendo uma gradativa deterioração de suas características físicas e químicas, as quais prejudicam as condições biológicas dessa bacia, resultando numa redução da biomassa e diversidade da ictiofauna.

6.4. Análise química da água

Os dois tratamentos analisados apresentaram pH com maior alcalinidade quando comparados com o controle (Controle: 5,39; Detergente: 6,04; Lago Azul:7,17). Esta modificação se deve a elevação na concentração de HCO_3^- presentes nas amostras (Controle: 1,2; Detergente: 6,04; Lago Azul: 7,17).

O grupo do detergente, ainda apresentou elevações consideradas significativas nos seguintes parâmetros: Na; NO_2^- e Ni. Como Capeleti (1993) postulam que as variações do ritmo migratório podem refletir as alterações físico-químicas pelas quais o Rio Mogi-Guaçu vem passando ao longo dos anos, pode-se cogitar que os elementos químicos como aqueles apresentados acima estão entre os que variam em corpos de água e afetam não só o padrão migratório, mas aspectos morfológicos como aqueles estudados no presente trabalho. Lembrando também que o padrão migratória e a morfologia são aqui relacionados.

Os resultados da análise de água são apresentados no relatório recebido do Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica do Instituto de Geociências e Ciências Exatas da UNESP de Rio Claro, no anexo ao final deste relatório.

7. CONCLUSÕES

- 1- o tecido adiposo de *Prochilodus lineatus* (curimbatá) é um tecido unilocular,
- 2- existe variação entre o tamanho dos adipócitos, de forma que nos meses de dezembro e novembro, os adipócitos são maiores e no mês de junho estes apresentam menor tamanho;
- 3- indivíduos machos apresentaram adipócitos maiores quando comparados às fêmeas;
- 4- exposição de *P. lineatus* (curimbatá) a solução de detergente, demonstrou a alteração do tecido adiposo, com a redução do mesmo.

8. BIBLIOGRAFIA

- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.. Biologia Molecular da Célula, 4ª Edição. São Paulo: editora Artimed, 2006.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. Química orgânica. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978. Tradução de Alencastro, R. B.; Peixoto, J. S.; Pinho, L. R. N.
- AHIMA RS, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. Elsevier Science Ltd., v11, nº8, p327-32, 2000.
- BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Saminus maxillosus* e do corimbatá, *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). Acta Limnologica Brasiliensia. 2000.
- BALDISSEROTTO, BERNARDO. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Editora UFSM. 2ªed. Santa Maria. 2009. 352p.
- BOMBARDELLI, R. L. Energia digestível para reprodutores de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus* L.). 89f. Doutorado e área de concentração Produção Animal. Universidade Estadual de Maringá Centro de Ciências Agrárias. Maringá. 2007.
- BRAGA, F.M. DE SOUZA; GOMIACO, L. M.; SOUZA, U. P. Aspectos da reprodução e alimentação de *Neoplecostomus micros* (Locariidae, Neoplecostominae) na microbacia do Ribeirão Grande, Serra da Mantiqueira Oriental (Estado de São Paulo). Maringá, v.30, n.4. 455-463, 2008.
- CAPELETI, A. R.. A migração e a dinâmica da população do curimbatá (*Prochilodus lineatus*) revisitado na Cachoeira de Emas do rio Mogi-Guaçu - SP. 1993. 57f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Biociências, Universidade Paulista, Rio Claro, SP. 1993.
- CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C.B.C. Células: Uma abordagem multidisciplinar. Barueri, Editora Manole, v. 1. 860 p. 2005.
- CYRINO, J. E. P. Desenvolvimento e ciclo de maturação sexual do corimbatá *Prochilodus scrota* Steindachner 1881 (Pisces Prochilodontidae) no baixo do Mogi-Guaçu. 1979. 54f. Trabalho de conclusão de curso – Faculdade Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1979.
- DE MAURO, C. A. de. Rio Claro – O lançamento “in natura” de esgotos em corpos d’água. In: CURSO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA: VAMOS CONHECER RIO CLARO. Rio Claro. Laboratório de Planejamento Municipal – LPM, DEPLAN – IGCE/UNESP, Rio Claro, 1993. P.67-86.
- FONSECA-ALANIZ, TAKADA, J., ALONSO-VALE M. I. C., LIMA, F. B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. Arq Bras Endocrinol Metab v. 50, nº 2, p216-29, 2006.
- GARCIA, M. P; CHAVES, S. B; AZEVEDO, R.B..Entendendo a Gordura - os Ácidos Graxos. Editora Manole Ltda, P.160-71, 2002.
- GENESER, F. Histologia: com bases biomoleculares. Traduzido por Jorge Mamede de Almeida, Severo de Paoli, Tânia dos Santos Giani. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- GODOY, MP. Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging and transplantation of the curimbatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guaçu river, São Paulo State, Brazil. An. Acad. Bras. Ciênc. vol. 31, nº 3, p. 447-477. 1959.

- GODOY, M.P. Peixes do Brasil: sub-ordem Characoidei: Bacia do Rio Mogi-Guaçu. Piracicaba: Editora Franciscana, 1975. p. 624 – 847, 1975.
- GODOY, M.P. Peixes e pesca do Rio Paraná: área do futuro Reservatório de Ilha Grande. Florianópolis: ELETROSUL. 1986. 148p.
- GUGLIELMO, C. G.; WILLIAMS, T. D.; ZWINGELSTEIN, G.; BRICHON, G. WEBER, J. M. Plasma and muscle phospholipids are involved in the metabolic response to long-distance migration in a shorebird. Journal of Comparative Physiology B, v. 172, n. 5, p. 409-417, 2002.
- HEKTOEN H, INGEBRIGTSEN K, BREVIK EM, OEHME M. Interspecies differences in tissue distribution of 2, 3, 7, 8-terachlorodibenzo-p-dioxin between cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Chemosphere. nº 24, p.581–7. 1992.
- ISSA, J. P. M; PITOL, D. L.; IYOMASA, A. P. B.; DEFINO, H. L. A.; VOLPON, J. B.; SHIMANO, A. C.; SILVA, P. Collagen fibers evaluation after rhBMP-2 insertion in critical-sized defects. Micron, v. 40, p. 506-562, 2009.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. Histologia Básica. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, L.M.M.S..Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. 1ª edição. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983.
- KIERSZENBAUM, A. L. Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia. Tradução: Nádia Vieira Rangel, Rodrigo Alves Azevedo. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004, 654 p.
- KONDO, H.; SUGA, R.; SUDA, S.; NOZAK, R.; HIRONO, I.; NAGASAKA, R.; KANEKO, G.; USHI, H.; WATABE, S. EST analysis on adipose tissue of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and tissue distribution of adiponectin. Gene, v. 485, p. 40–45. 2011.
- LETCHER, B. H., GRIES, G.; JUANES, F. Survival of stream-dwelling Atlantic salmon: effects of life history variation, season, and age. Transactions of the American Fisheries Society, v.131, p.838-854. 2002.
- LETCHE, R. J.; BUSTNES, J.O.; DIETZ, R.; JENSSEN, B. M.; JENSSEN, E. H.; SONNE, C.; VERREAUL, J.; VIJAYAN, M. M.; GABRIELSEN, G. W. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. Science of the Total Environment, v. 408, p.2995–3043. 2010.
- MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R.. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, v. 148, p 265-272. 2008.
- MACHADO, M. R. F. Características morfológicas e corporais de curimatá *Prochilodus lineatus* (Characiforme: Prochilodontidae) dos estoques migradores e residentes do rio Mogi-Guaçu. 2007. 80f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura, Universidade Paulista, Jaboticabal, 2007.
- MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M.. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz. J. Biol, v.64 nº.4. Nov. 2004.
- MAZON, A. F. & FERNANDES, M. N.. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol., v. 63, p. 797-804.1999.
- MAYER, F. L., VERSTEEG, D. J., MCKEE, M. J., FOLMAR, L. C., GRANEY, R. L., MCCUME, D. C. & RATTNER, B. A.. Physiological and non-specific biomarkers. In: R. J. Huggett, R. A. Kimerle, P. M. Mehrle-Jr. & H. L. Bergman (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, Fl. 1992

- MCWILLIAMS, S. R., GUGLIELMO, C., PIERCE, B. and KIAASSEN, M. Flying, fasting, and feeding in birds during migration: a nutritional and physiological ecology perspective. J. Avian Biol. v. 35, p. 377-393. 2004
- MELO, R.C.N.. Células & Microscopia. 1a Ed. Juiz de Fora – MG. Editora UFJF. 2002. 144p.
- MUMFORD, S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J.; MACCONNELL, B.; BLAZER, V.. Fish Histology and Histopathology. Shepherdstown, West Virginia – United States of America, National Conservation Training Center. 2010. 357p.
- NIKOLSKY, G. V. Theory of fish population dynamics as the background for rational exploitation and management of fishery resources. Oliver & Boyd, Edinburgh. 1969.
- NIKOLSKY, G.V. The ecology of fishes. London; Academic Press, 352p. 1963.
- OLIVEIRA, M. I. B. Determinação da idade e aspectos da dinâmica populacional do curimatã Prochilodus nigricans (pisces; prochilodontidae) da Amazônia Central. Tese (Doutorado), Manaus, 1997.
- PAULETE, J.; BEČAK, W. Técnicas de Citologia e Histologia. 2 Vols. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- PRICE, E.R.. Dietary lipid composition and avian migratory flight performance: Development of a theoretical framework for avian fat storage Comparative Biochemistry and Physiology Part A, v. 157, p. 297–309. 2010.
- PRICE, E. R.; KROKFORS, A.; GUGLIELMO, C. G. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue in migratory birds. The Journal of Experimental Biology, v. 211, p. 29-34. 2007.
- RACLOT, T. Selective mobilization of fatty acids from adipose tissue triacylglycerols. Prog. Lipid Res., v.42, p. 257 -288. 2003.
- RACLOT, T.; HOLM, C.; LANGIN, D.. Fatty acid specificity of hormone-sensitive lipase: implication in the selective hydrolysis of triacylglycerols. J. Lipid Res., v. 42, p. 2049 -2057. 2001.
- RIOS, F.S; CARVALHO, C. S.; PINHEIRO, G. H. D.; DONATTI, L.; FERNANDES, M. N.; RANTIN F.T. Utilization of endogenous reserves and effects of starvation on the health of Prochilodus lineatus (Prochilodontidae). Environ Biol Fish, v. 91, p. 87–94. 2011.
- ROY, D. Impacto of detergents on the protein histochemistry of various cell types of the Gill epithelium of Rita rita. Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 15, p. 206-211, 1988.
- SILVA, R. G. da. Análise da estrutura genética populacional do curimatã (Prochilodus lineatus, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP. 112f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006.
- SMITH, C. L. Seasonal changes in blood sugar, fat body, liver glycogen, and gonads in the common frog Rana temporaria. The Journal of Experimental Biology, v. 26, p. 412-429, 1950.
- THOMAS, P.. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. In: S. M. Adams (ed.), Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 1990.
- WANG, Y.; CHEN, P.; CUI, R.; SI, W.; ZHANG, Y.; JI, W. Heavy metal concentrations in water, sediment, and tissues of two fish species (Triphysa pappenheimi, Gobio hwanghensis) from the Lanzhou section of the Yellow River, China. Environ Monit Assess, v. 165, p.97–102. 2009.

WANG, N.; SHI, L.; KONG, D.; CAI, D.; CAO, Y.; LIU, Y.; PANG, G.; YU, R. Accumulation levels and characteristics of some pesticides in human adipose tissue samples from Southeast China. Chemosphere, v. 84, p. 964–971. 2011.

- WENDELAAR BONGA, S. E.. The stress response in fish. Physiol. Rev., v. 77, p. 591-625. 1997.

9. Anexos

9.1. Relatório de análises químicas



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"



INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS E CIÊNCIAS EXATAS

Laboratório de Hidrogeologia e Hidrogeoquímica – H₂L

RELATÓRIO DE ANÁLISES QUÍMICAS

Interessado: Flavio Caetano

Material Entregue Declarado: Água

Natureza do Trabalho: Diversas Determinações

Referência: 3 amostras abaixo identificadas

RESULTADOS:

H ₂ L	Amostra	Temp.	Cond.	pH	Alcalinidade		Li	Na	NH ₄	K
No.	Identif.	°C	µS/cm		HCO ₃ ⁻	CO ₃ ²⁻	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
4184	Controle 08/06/11	15,6	282	5,39	1,2	ND	< 0,01	17,5	10,7	6,39
4185	Detergente 08/06/11	15,4	237	6,04	4,9	ND	< 0,01	20,1	2,15	6,68
4186	Lago Azul 08/06/11	15,5	179	7,17	59,3	ND	< 0,01	16,9	0,76	3,94

H ₂ L	Amostra	ClO ₂ ⁻	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻	Acetato	C ₂ O ₄ ²⁻
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
4184	Controle 08/06/11	<0,01	0,25	8,56	<0,04	121	18,9	11,6	<0,10	<0,03
4185	Detergente 08/06/11	<0,01	0,23	5,56	1,15	106	9,33	10,4	<0,10	<0,03
4186	Lago Azul 08/06/11	<0,01	0,40	16,7	0,86	8,78	<0,14	15,1	<0,10	<0,03

H ₂ L	Amostra	Al	Ba	Ca	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
4184	Controle 08/06/11	0,10	0,075	18,6	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,021
4185	Detergente 08/06/11	0,079	0,092	17,8	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,010	0,029
4186	Lago Azul 08/06/11	0,15	0,027	18,7	< 0,010	< 0,010	< 0,010	< 0,010	0,16

H ₂ L	Amostra	Mg	Mn	Ni	P	Pb	Si	Sr	Zn
No.	Identif.	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
4184	Controle 08/06/11	3,69	0,27	< 0,010	6,79	< 0,020	5,72	0,12	0,84
4185	Detergente 08/06/11	4,55	0,21	0,066	3,46	< 0,020	6,30	0,12	0,50
4186	Lago Azul 08/06/11	3,33	0,089	< 0,010	< 0,10	< 0,020	4,27	0,10	0,050

As análises estão baseadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 21^a edição, 2005.

Os metais foram analisados por Espectrometria de Emissão Atômica com Fonte de Plasma de Argônio Indutivo (ICP-AES).

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

Rio Claro, 27 de julho de 2011.

MSc. Mirtis Irene Ariza Malagutti

VMP				VMP			
Parâmetro	LQ H ₂ L (mg L ⁻¹)	RDC 274 (mg L ⁻¹)	Portaria 518 (mg L ⁻¹)	Parâmetro	LQ H ₂ L (mg L ⁻¹)	RDC 274 (mg L ⁻¹)	Portaria 518 (mg L ⁻¹)
Cátions				Ânions			
Alumínio	0,010	---	0,2	Acetato	0,12		---
Bário	0,005	0,7	0,7	Bicarbonato	2,00		---
Cádmio	0,010	0,003	0,005	Bromato	0,01		0,025
Cálcio	0,050	---	---	Brometo	0,19	---	---
Chumbo	0,020	0,010	0,01	Carbonato	2,00		---
Cobalto	0,010	---	---	Cloreto	0,01	---	250
Cobre	0,010	1	2	Clorito	0,01		0,2
Cromo	0,010	0,05	0,05	Fluoreto	0,01	---	1,5
Estrôncio	0,003	---	---	Fosfato	0,14	---	---
Ferro	0,010	---	0,3	Nitrato	0,06	50	10*
Lítio	0,01	---	---	Nitrito	0,04	0,02	1*
Magnésio	0,025	---	---	Oxalato	0,02		---
Manganês	0,010	0,5	0,1	Sulfato	0,02	---	250
Níquel	0,010	0,02	---				
Potássio	0,04	---	---				
Silício	0,20	---	---				
Sódio	0,01	---	200				
Vanádio	0,010	---	---				
Zinco	0,010	---	5				

Observações:

* Calculado como N

VMP – valor máximo permitido

LQ – limite de quantificação