

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CYNTHIA MEDINA CIAMARRO

**HISTOQUÍMICA DE MUSCULATURAS DE
ASTYANAX ALTIPARANA DE
AMBIENTES PERTURBADOS**



Rio Claro
2013

CYNTHIA MEDINA CIAMARRO

HISTOQUÍMICA DE MUSCULATURAS DE *ASTYANAX*
*ALTIPARANA*E DE AMBIENTES PERTURBADOS

Orientador: 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” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau
de Bacharela em Ciências Biológicas

Rio Claro
2013

597 Ciamarro, Cynthia Medina
C565h Histoquímica de musculaturas de *Astyanax altiparanae* de
ambientes perturbados / Cynthia Medina Ciamarro. - Rio
Claro, 2013
37 f. : il., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biotecnologia de Rio Claro

Orientador: Flávio Henrique Caetano
Coorientador: Bruno Fiorelini Pereira

1. Peixe. 2. Histologia. 3. Ictiologia. 4. Poluente. 5.
Morfologia. I. Título.

RESUMO

Atualmente, é grande a quantidade de cursos d'água continentais que se encontram contaminados por poluentes, tais como produtos químicos, metais, esgoto e detergentes biodegradáveis. Tendo em vista o fato de a musculatura possuir um papel fundamental na realização do nado em peixes, sua importância se reflete em atividades como caça, fuga, procura pelo alimento, defesa, migração, etc. Alterações na estrutura muscular de peixes, que possam vir a ocorrer devido à presença de poluentes na água trarão sérias implicações para o modo de vida destes, especialmente no caso de *Astyanax altiparanae* que é uma espécie pelágica e nadadora ativa. Conseqüentemente, tem havido uma crescente preocupação em relação aos poluentes e os efeitos que estes podem ter sobre as populações de peixes que habitam esses ambientes aquáticos poluídos, uma vez que estes constituem uma das fontes de alimento mais importantes para certas populações humanas assim como a principal fonte de renda para comunidades pesqueiras. Sendo assim, pretendeu-se por meio do presente estudo, analisar e identificar possíveis alterações na estrutura morfológica da musculatura peitoral e caudal em peixes de pequeno porte como *Astyanax altiparanae*, bem como analisar a ocorrência de um possível envelhecimento precoce destas, que possam ter sido causados pelos poluentes contidos na água com detergente diluído, na água do Lago Azul, Rio Claro, SP, em comparação com a água pura do poço artesiano da UNESP – Campus Rio Claro que foi clorada de acordo com o modelo requerido pela SABESP e constituiu o grupo controle. A análise foi feita com base na comparação do grupo controle com aqueles expostos aos poluentes e foram utilizadas técnicas de histologia, histoquímica e fluorescência.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. MATERIAL

Figura 1 - Estrutura montada na UNESP – Campus de Rio Claro, contendo caixas de polietileno de 500L, nas quais parte do experimento foi realizado.....10

2. METODOLOGIA

2.1. Figura 2 - Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pelo glicogênio.....13

2.2. Figura 3 - Layout do programa ImageJ durante a realização das medidas do diâmetro das fibras musculares.....14

2.3. Figura 4 - Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pelo colágeno total.....15

2.4. Figura 5 - Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III e pelo colágeno total.....16

2.5. Figura 6 - Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pela lipofuscina.....17

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1. Descrição do tecido muscular.....	5
1.2. Os músculos vermelho e branco.....	6
1.3. O envelhecimento muscular.....	9
1.4. Lipofuscina.....	9
1.5. Biologia de <i>Astyanax altiparanae</i> (Characidae)	10
1.6. Detergentes Biodegradáveis.....	11
1.7. Caracterização do Lago Azul.....	12
1.8. Justificativa.....	12
2. OBJETIVOS.....	13
3. MATERIAL.....	13
4. METODOLOGIA.....	14
4.1. Análises de histologia e histoquímica.....	15
4.2. Análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio.....	16
4.3. Análise do diâmetro das fibras musculares.....	17
4.4. Análise quantitativa de colágeno.....	18
4.5. Análise da área total ocupada pelos colágenos dos tipos I e III.....	19
4.6. Análise da área total ocupada pela lipofuscina.....	20
5. RESULTADOS.....	21
5.1. Análise química da água utilizada no experimento.....	21
5.2. Análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio.....	22
5.3. Análise do diâmetro das fibras musculares.....	23
5.4. Análise quantitativa de colágeno.....	25
5.5. Análise da área total ocupada pelos colágenos dos tipos I e III.....	24
5.6. Análise da área total ocupada pela lipofuscina.....	30
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÕES.....	34
8. REFERÊNCIAS.....	35

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Descrição do tecido muscular

O músculo é um tecido que gera e transmite a força (SCHMIDT-NIELSEN, 2010). Segundo Alberts et al. (2004), podem haver vários tipos de células musculares como por exemplo as células do músculo esquelético, do músculo cardíaco e do músculo liso. Junqueira e Carneiro (2008), descrevem o tecido muscular esquelético como sendo formado por feixes de células muito longas, cilíndricas e multinucleadas, sendo estas responsáveis por praticamente todos os movimentos que estão sob controle voluntário.

Ainda numa descrição das células do tecido muscular, Schmidt-Nielsen (2010), as descrevem como células grandes e multinucleadas formadas durante o desenvolvimento embrionário pela fusão de várias células. Os núcleos encontram-se logo abaixo do sarcolema (MUMFORD et al., 2007). Esta localização nuclear característica ajuda a distinguir o músculo esquelético do músculo cardíaco, ambos com estriações transversais, pois no músculo cardíaco os núcleos são centrais (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

O aspecto estriado deste músculo deve-se ao arranjo regular de filamentos grossos e finos, em feixes denominados miofibrilas (VIDELER, 1993). A disposição dos filamentos é extremamente regular e bem ordenada (SCHMIDT-NIELSEN, 2010). Tanto é que, conforme o descrito por Junqueira e Carneiro (2008), quando observadas ao microscópio óptico, as fibras musculares esqueléticas mostram estriações transversais, pela alternância de faixas claras e escuras.

Dal Pai et al. (2008), destaca a importância do músculo estriado esquelético dos peixes ao afirmar que este tipo de músculo representa a maior parte da massa corporal destes, constituindo de 40 a 75% do peso total do animal. A mesma autora diferencia a distribuição das fibras musculares em peixes e mamíferos partindo do fato de que na maioria das espécies de peixes, as fibras musculares estão distribuídas em áreas ou compartimentos distintos, enquanto que em mamíferos, observa-se um padrão de distribuição em mosaico. Santos (2007) ainda aponta algumas características do sistema muscular de peixes que não são comumente encontradas em outros vertebrados tais como as fibras contráteis multiplamente inervadas dos peixes, o fato de nenhuma musculatura de peixes conter músculos alongados ou ainda o músculo destes conter menor quantidade de colágeno por possuir significativamente menos ligações cruzadas que a carne de aves e mamíferos.

Envolvendo as fibras musculares, existe tecido conjuntivo que as mantém unidas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Porém, Alexander (1969 apud DAL PAI et al., 2008) e

Hibiya (1982) descrevem os miômeros de peixes como sendo separados por bainhas de tecido conjuntivo denominados miosseptos. É importante ressaltar que, de acordo com Santos (2007), a arquitetura desses miômeros não é muito conhecida, particularmente os detalhes da estrutura anatômica do sistema muscular e dos tecidos conjuntivos e suas relações. Em uma definição do tecido conjuntivo, Schmidt-Nielsen (2010) o descreve como também sendo responsável por fornecer um substrato contra o qual as fibras possam empurrar e um dos principais componentes deste é o colágeno.

O colágeno é o principal constituinte do tecido conectivo do músculo de peixes (SUAREZ, 2005). Foi demonstrado por vários pesquisadores que a firmeza do músculo do peixe está diretamente relacionada ao seu conteúdo de colágeno (HATAE et al. 1986; SATO et al. 1986, 1997; SIKORSKI, 1990; ANDO et al. 1992 apud SUAREZ, 2005). Além disso, de acordo com Sato (1989), nos peixes foi demonstrado que o colágeno tem um importante papel ao manter a estrutura das fibras musculares durante os movimentos do nado.

Segundo o descrito por Hibiya (1982), o músculo esquelético (ou estriado voluntário) forma a maior parte da porção comestível do corpo dos peixes. Além disso, de acordo com o mesmo, a musculatura estriada também inclui músculos associados ao movimento das nadadeiras (músculos flexores das nadadeiras caudal e peitorais e músculos elevadores das nadadeiras dorsal e anal) assim como os movimentos de abertura e fechamento da boca.

Células do tecido muscular são extremamente plásticas e adaptáveis (SÄNGER, 1993 apud SANTOS, 2007). Sendo assim, de acordo com Santos (2007), até mesmo em animais adultos as células musculares não são estáticas, sendo capazes de alterar suas propriedades contráteis e metabólicas. O mesmo autor ainda afirma que diferentemente do que se verifica em aves e mamíferos, a hiperplasia muscular ocorre mesmo após o nascimento e contribui em grande parte para o processo de crescimento.

1.2 – Os músculos vermelho e branco

Videler (1993) relata que, de acordo com uma referência feita por Bone (1966), foi Lorenzini quem em 1678 descreveu pela primeira vez as fibras de músculo branco e vermelho no elasmobrânquio *Torpedo*. O papel fisiológico do músculo vermelho é conhecidamente diferente daquele do músculo branco (SUZUKI et al., 1987). De acordo com Arking (2008), esses músculos também se diferem em relação ao seu inventário enzimático e, conseqüentemente, em sua aparência. Segundo Schmidt-Nielsen (2010), o músculo tônico, ou vermelho está localizado nas laterais do corpo do animal, se estende em direção à coluna

vertebral e apresenta essa coloração vermelho-escuro devido à alta concentração de mioglobina, fato reforçado por Hybiya (1982) em sua descrição de que o músculo vermelho exibe vascularização particularmente bem desenvolvida. Ambas as descrições estão de acordo com afirmação de Santos (2007), de que a cor do músculo é indicativo do grau de vascularização de cada tipo de fibra. Os vasos sanguíneos penetram no músculo através dos septos de tecido conjuntivo e formam extensa rede de capilares que ocorrem entre as fibras musculares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Numa descrição da musculatura vermelha, Santos (2007) e Dal Pai et al. (2008) restringem sua localização nos peixes à região da linha lateral. A área transversal ocupada pelas fibras vermelhas muda ao longo do corpo do peixe (VIDELER, 1993). De acordo com este autor, essa camada muscular superficial apresenta fibras de direção reta e longitudinal.

Segundo a descrição feita por Mumford et al. (2007), nos peixes, este tipo de músculo possui um teor mais alto de lipídios do que a musculatura branca, um número maior de mitocôndrias por célula assim como maior atividade respiratória. Ainda de acordo com o mesmo autor, as fibras vermelhas são aeróbicas e de contração lenta. Santos (2007) descreve essas fibras como usualmente constituindo menos de 10% e nunca mais 30% da musculatura miotomal, sendo consideradas fibras de pequeno diâmetro (25-45 μm).

De acordo com Wardle et al. (1995), esse tipo de musculatura é usada em nados lentos, porém conforme a velocidade do nado aumenta, há um incremento progressivo na utilização do músculo branco. Entretanto, a natação à velocidade cruzeiro é inteiramente executada pelo músculo vermelho e a grande massa de músculo branco (tipo fásico) representa uma reserva de força para curtos surtos de atividade de alta velocidade (SCHMIDT-NIELSEN, 2010). Além disso, Whitbourne (1985 apud ARKING, 2008) também associa a musculatura vermelha a atividades como reajustes posturais, que requerem um esforço mais prolongado e duradouro, mas não necessariamente rápido.

Segundo Altringham & Ellerby (1999), em certas espécies de peixes, a musculatura branca constitui uma importante fração da massa total do animal, podendo representar de 80% a 100% em um determinado ponto da secção transversal. Essas fibras são descritas por Santos (2007) como sendo as fibras de maiores diâmetros, atingindo entre 50 e 100 μm . Mumford et al. (2007), faz uma associação da musculatura branca às explosões de movimento de curta duração, embora sejam fortes. Dal Pai et al. (2008) exemplifica estas explosões de movimento como ocorrendo durante a captura de alimento ou na fuga de predadores.

Tomando como referência a descrição da musculatura branca feita por Mumford et al. (2007) e Dal Pai et al. (2008), nota-se claramente o contraste que há entre esta e a musculatura

vermelha, pois a musculatura branca realiza contração rápida, apresenta baixa quantidade de mitocôndrias e baixa atividade respiratória, sendo que as fibras brancas apresentam fadiga mais rapidamente que as fibras vermelhas, são anaeróbicas e possuem metabolismo glicolítico.

Segundo Nag (1972), no caso de *Salmo gairdneri* as fibras musculares vermelha e branca diferem-se também em seu diâmetro, organização das miofibrilas, dimensão dos miofilamentos, morfologia da mitocôndria, conteúdo da mitocôndria, lipídio e glicogênio. Além disso, ainda de acordo com este mesmo autor, estudos bioquímicos mostraram que as actinmiosinas das fibras brancas apresentam uma atividade de ATPase três vezes maior que as actinmiosinas das fibras vermelhas, embora as fibras vermelhas apresentem um teor mais alto de actinmiosina que as fibras brancas.

Segundo Boddeke et al. (1959 apud VIDELER, 1993), a proporção de fibras brancas e vermelhas presentes no corpo do peixe, está relacionada ao modo de vida deste, sendo assim, peixes pelágicos possuem maior proporção de fibras vermelhas enquanto que nos músculos laterais de peixes bentônicos as fibras brancas predominam. Esse fato é reforçado por Love (1970 apud SUZUKI et al., 1987), ao dizer que a proporção de músculo vermelho e músculo branco varia entre as espécies de peixes, aumentando com a atividade natatória destes. Johnston (1981 apud ALTRINGHAM & ELLERBY, 1999) aponta que algumas espécies de peixe também apresentam uma camada intermediária de músculo rosa, a qual Videler (1993) descreve como possuindo velocidade de contração intermediária. Além disso, Santos (2007) afirma que as fibras rosa apresentaram maior tamanho que as vermelhas na análise feita em diversas espécies a partir de estudos morfométricos e que em geral são menores que as brancas, o que sugere que a camada rosa seja uma área ativa para suprimento de novas fibras, geralmente de músculo branco e, raramente, de músculo vermelho.

Este mesmo autor ainda lista algumas diferenças que as fibras apresentam em suas propriedades ultra-estruturais como espessura da linha-Z; banda-M; volume, densidade e distribuição do retículo sarcoplasmático (SR); e sistema de túbulos-T.

Ainda conforme o relatado por Videler (1993), as primeiras descrições acuradas da complexidade geométrica dos músculos axiais de peixe datam da primeira metade do século XX, com importantes contribuições de Greene & Greene (1913), Shann (1914), Kishinouye (1923) e Nishi (1938). Segundo Altringham & Ellerby (1999), a musculatura dos peixes é organizada em segmentos de miótomos que formam cones empilhados, nos quais a fibra muscular segue complexas trajetórias helicoidais de um miótomo a outro ao longo do corpo

do animal e por sua vez, as fibras são orientadas de modo a formar ângulos de aproximadamente 40° com o eixo longitudinal do peixe.

1.3 – O envelhecimento muscular

Para Kaldor e DiBattista (1978), caracterizar o processo de envelhecimento do músculo esquelético é complicado pelo fato de que as fibras deste não constituem um tecido homogêneo, além de que o estado em que o tecido se encontra numa determinada época da vida depende da extensão e da natureza de influências tróficas. E ainda, o declínio característico da capacidade muscular, que está associado à idade avançada, é variável, podendo inclusive ser causado por mudanças secundárias nos músculos induzidas pelo envelhecimento de outros sistemas tais como nervoso, vascular e endócrino. Uma das mudanças associadas à idade sofridas pela musculatura esquelética é a diminuição da massa muscular e segundo Schneider e Rowe (1990), além dessa diminuição da massa muscular, outro declínio proeminente sofrido pelo músculo com o envelhecimento é a redução na capacidade máxima de exercício.

Quanto à atrofia muscular em função do envelhecimento, de acordo com Schneider e Rowe (1990), esta pode ocorrer de modos diferentes nas fibras de contração rápida e naquelas de contração lenta. No primeiro caso, as fibras diminuem em número e tamanho, enquanto que no último caso, elas apenas diminuem em número.

1.4 - Lipofuscina

Segundo Arking (2008) em sua forma mais simples, a teoria do acúmulo de resíduos propõe que o envelhecimento celular é causado pelo acúmulo de produtos residuais intracelulares que não podem ser destruídos ou eliminados exceto através do processo de divisão celular. Já é de conhecimento geral que as células pós-mitóticas, tal como os neurônios e as células do músculo cardíaco, acumulam depósitos de grânulos citoplasmáticos de cor marrom amarelada, ricos em lipídios e de formato irregular, durante o processo de envelhecimento. Esses grânulos de lipofuscina foram observados pela primeira vez em 1842, e a possibilidade de uma relação entre o envelhecimento e o acúmulo de lipofuscina foi discutida já em 1886. Numerosos estudos foram realizados desde então em um esforço para compreender os mecanismos responsáveis pela formação da lipofuscina e para esclarecer o papel dela no processo de envelhecimento.

Segundo Silva & Silva (2005) e Kishi et al. (2008) a lipofuscina, é um produto da peroxidação lipídica e uma evidência de lesão oxidativa; produtos finais resultantes da glicosilação não-enzimática celular e por degradação incompleta de mitocôndrias danificadas que não podem ser degradados pelas hidrolases lisossomais nem ser exocitadas, acumulando-se ao longo do tempo nas células pós-mitótica e não são diluídos por divisão; importantes não só no envelhecimento, mas também no diabete, e seu acúmulo intracelular pode resultar no aparecimento de doenças . Segundo Radu et al. (2005) uns dos principais componentes da lipofuscina é a bis-retinoide, N-retinolidina-retinoletanolamina (A2E), que confere a lipofuscina a autofluorescência. As propriedades biológicas da A2E têm sido extensivamente estudadas. Notavelmente, A2E tem demonstrado possuir várias propriedades citotóxicas, como por exemplo, a inibição das funções degradativas dos lisossomos, a indução a apoptose e pode agir como um “detergente catiônico, dissolvendo as membranas celulares. O principal gene relacionado a formação da lipofuscina é o gene ABCA4, cuja baixa expressão gera o acúmulo deste pigmento, o que pode ocorrer não só com o envelhecimento mas também com o stress oxidativo; em peixes a proteína que exerce esta função é CH211-195I6.3 expressa pelo gene 555506.

Segundo Arking (2008) a lipofuscina não parece ser muito reativa quimicamente e provavelmente não interfere no funcionamento adequado da célula no nível químico; no entanto, a obstrução mecânica e/ou a interferência com outros processos celulares é certamente uma possibilidade.

Até o presente momento nenhum trabalho foi realizado visando observar os possíveis efeitos de um possível acúmulo deste grupo de proteínas em peixes de ambientes neotropicais.

1.5 - Biologia de *Astyanax altiparanae* (Characidae)

Os lambaris ou tambius pertencem à subfamília Tetragonopterinae, que são estritamente de água doce e na família Characidae são os que apresentam o maior número de espécies, sendo o gênero *Astyanax* o mais comum no Estado de São Paulo (NOMURA, 1975).

Os lambaris são altamente utilizados para consumo humano, porém apresentam médio valor comercial devido ao seu pequeno tamanho. Por outro lado, possuem grande valor ecológico como espécie forrageira (GODOY, 1975). Além disso, são considerados transformadores de partículas orgânicas em proteína, que por sua vez deverá alimentar aves e peixes pertencentes a níveis tróficos superiores, como os piscívoros.

A espécie *Astyanax altiparanae* caracteriza-se por apresentar o corpo prateado, com a região ventral esbranquiçada e a região dorsal cinzenta, as nadadeiras caudal, anal e pélvica são amareladas enquanto as demais são hialinas ou levemente amareladas. Na caudal, ainda, há uma faixa mediana negra estendida à extremidade dos raios medianos, separando os lobos superior e inferior. Acima da pupila, há uma mancha amarelo-ferrugem (BRITSKI, 1988) sendo esta espécie conhecida popularmente por lambari relógio ou lambari-de-rabo-amarelo. Contudo, como esta espécie ocorre numa grande diversidade de microambientes, as populações desse lambari não são homogêneas quanto à morfologia.

Essa espécie apresenta grande capacidade adaptativa exploratória, utilizando estratégias diferenciadas na estrutura da população (GOMIEIRO & BRAGA, 2003). Portanto, a elevada plasticidade alimentar de *Astyanax altiparanae*, bem como sua capacidade de se reproduzir em todos os ambientes, explicam o sucesso desta espécie no processo de colonização de novos habitats. Entretanto, observa-se uma preferência pela permanência em águas mais lânticas.

1.6 - 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, quando as águas residuais são despejadas em rios e lagos pelo aumento na velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninha. Este 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).

1.7 - Caracterização do Lago Azul

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. O córrego Servidão, que nasce próximo 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, carregavam 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.

1.8 - Justificativa

Neste trabalho foram abordadas tanto as prováveis mudanças morfológicas ocorridas na musculatura peitoral e caudal de peixes quanto ao possível envelhecimento precoce destas em virtude da exposição dos peixes ao poluente testado.

Atualmente, os cursos d'água continentais recebem poluentes resultantes de diversas atividades humanas. Esses cursos d'água são habitados por populações de peixes, que conseqüentemente, ficam expostas aos poluentes.

Sabe-se que os peixes são animais muito susceptíveis a mudanças em seu ambiente, entretanto pouco se sabe dos reais efeitos de poluentes nas musculaturas branca e vermelha e quais seriam seus possíveis efeitos na ecologia e fisiologia dos peixes. A metodologia proposta por este trabalho buscou não só elucidar tais questões, quanto propor uma nova linha de estudo em peixes neotropicais, relacionando os poluentes ao envelhecimento celular.

Com isso, consideramos que este trabalho foi de grande valia, não só para a obtenção de dados morfológicos dos efeitos de poluentes, mas também trouxe uma nova visão de tais danos a fisiologia, e ecologia de peixes.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho visou identificar tanto as prováveis alterações morfológicas no tecido da musculatura, tanto brancas como vermelha, peitoral e caudal de *Astyanax altiparanae*, quanto o possível envelhecimento precoce, observado pelo acúmulo de lipofuscina, que estas estruturas sofreram em virtude da exposição destes indivíduos aos poluentes presentes no tratamento ao qual os peixes foram submetidos.

3 - MATERIAL

Para a realização deste experimento foram utilizados 60 indivíduos da espécie *Astyanax altiparanae*, os quais foram mantidos em três caixas de polietileno com capacidade para 500 litros cada, areadas constantemente (Figura 1), que receberam amostras de água de dois tratamentos e do controle. Tratamento 1: amostra de água coletada no Lago Azul (Rio Claro- São Paulo); Tratamento 2: água tratada com dez amostras de detergentes biodegradáveis de diversas marcas na concentração de 1:1000000 e controle: água comprovadamente limpa e clorada coletada do poço artesiano da UNESP - Campus Rio Claro.

Para análises histológicas, foram utilizados microscópios Leica DM2000 providos de câmera para captura de imagens.



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

4 - METODOLOGIA

Os espécimes foram divididos em três grupos (tratamento 1, tratamento 2 e tratamento 3) e cada grupo foi estocado em uma das caixas de 500 litros, contendo vinte indivíduos cada. O grupo controle foi exposto à água pura do poço artesiano da UNESP, que recebeu tratamento com cloro para evitar possíveis contaminações, sendo a única água disponível no campus para o experimento. Entretanto, a água foi oxigenada por uma semana antes do experimento para baixar os níveis de cloro. O Tratamento 1 foi exposto à água contendo uma mistura de dez marcas de detergentes biodegradáveis (Limpol, Ypê, Minuano, Qualitá, Amazon, Ariel, Colmax, Alpes, Lipon e Surf) em uma diluição de 1ppm, visando detectar alterações histológicas em níveis baixos de agentes poluentes. O Tratamento 2 foi exposto a 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, no presente estudo utilizou-se uma diluição de 1ppm, visando detectar alterações histológicas já 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, com isso 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.

Realizaram-se as coletas de material após os períodos de exposição de 7 e 30 dias. Para tanto, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e fragmentos do órgão foram extraídos, fixados em Bouin aquoso e preparados para as reações de H-E, PAS e Picrosirius red em historesina segundo Paulete & Beçak (1976) e segundo Pearse (1985). Para a realização de todas as técnicas, utilizou-se seis indivíduos de cada grupo, e as imagens obtidas no aumento de 100x foram analisadas com o auxílio do software ImageJ. Neste programa foram feitas a quantificação de glicogênio, de lipofuscina, de colágeno total e a medição do diâmetro das fibras musculares. Os protocolos de histologia e histoquímica estão descritos no item 4.1.

4.1 - Análises de histologia e histoquímica

- Hematoxilina e Eosina: 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. Para a realização desta técnica as lâminas foram deixadas em água destilada por 1 min, coradas com hematoxilina por 5min, reagiram com água por 4min, foram lavadas em água corrente, coradas com eosina por 5min e lavadas em água corrente.

- PAS (Ácido Periódico de Schiff): Segundo 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. Para a realização desta técnica as lâminas foram deixadas em ácido periódico 0,4% por 10min, lavadas em água destilada, reagiram com o reativo de Schiff por 1h no escuro, sendo por último lavadas em água sulfurosa (3 banhos de 1min. cada) e lavadas em água corrente por 10min.

- Picrosirius Red: Segundo Pearse (1985), esta técnica é usada para diferenciar fibras de colágeno do tipo I e III. O colágeno do tipo I é evidenciado pela coloração vermelha e o colágeno do tipo III é corado de verde. Para a realização desta técnica, as lâminas foram coradas com Picrosirius por 1h em estufa a 60°C, com o corante a mesma temperatura, depois lavadas em água destilada.

- Análise de Fluorescência: Assim como descrito anteriormente, a lipofuscina possui propriedade de autofluorescência, com isso, cortes sem coloração foram analisados ao microscópio de fluorescência Olympus – BX51 e fotografados no software DP – Controller, sob o filtro de luz de 450 – 490nm, segundo Peixoto et al. (2002).

4.2 - Análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio

Para a análise do glicogênio, cinco secções de cada indivíduo foram analisadas após a reação de PAS, nos quais cinco campos foram fotografados e analisados em cada corte. O glicogênio foi isolado com o auxílio do programa ImageJ, que realizou a contagem da área total ocupada por este (figura 2). Os dados de área gerados pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioEstat 5.0. Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos grupos e posteriormente ao teste ANOVA/Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis/Dunn, para dados não paramétricos, para determinar a significância dos resultados.

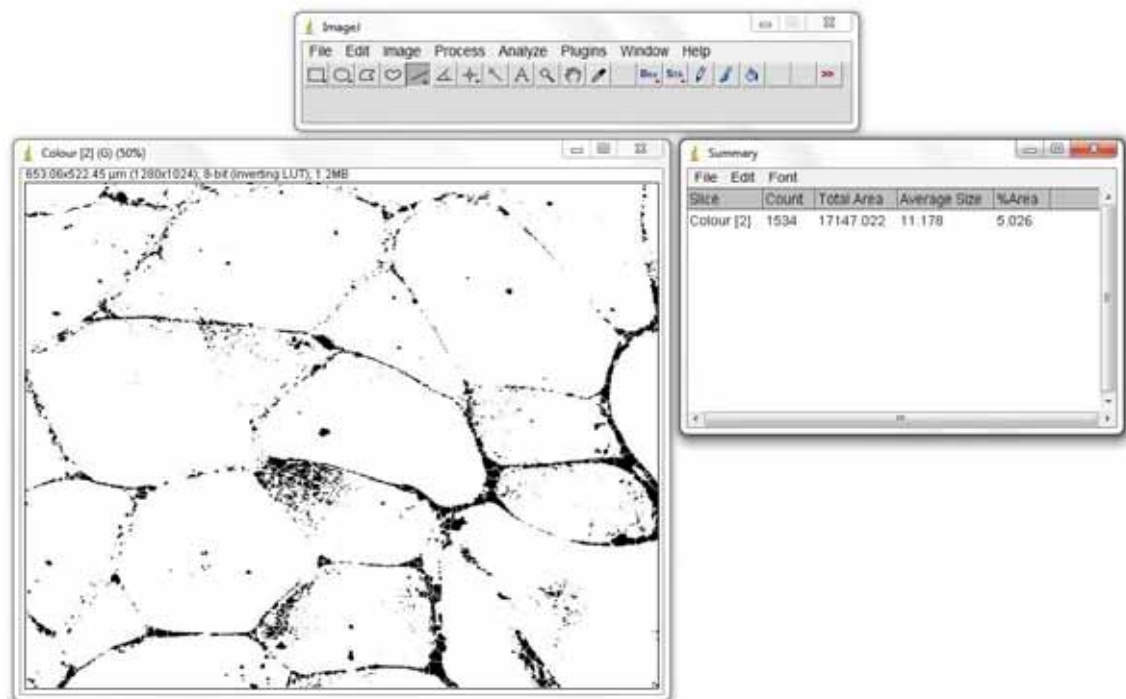


Figura 2: Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pelo glicôgeno

4.3 – Análise do diâmetro das fibras musculares

Para que fosse possível identificar a ocorrência ou não de variação deste parâmetro nas fibras musculares, no mínimo cinco imagens de cinco cortes de cada indivíduo foram obtidas, em cortes transversais após a reação de H-E. Em cada indivíduo foram analisadas 800 fibras musculares com o auxílio do programa de análise de imagem ImageJ (figura 3).

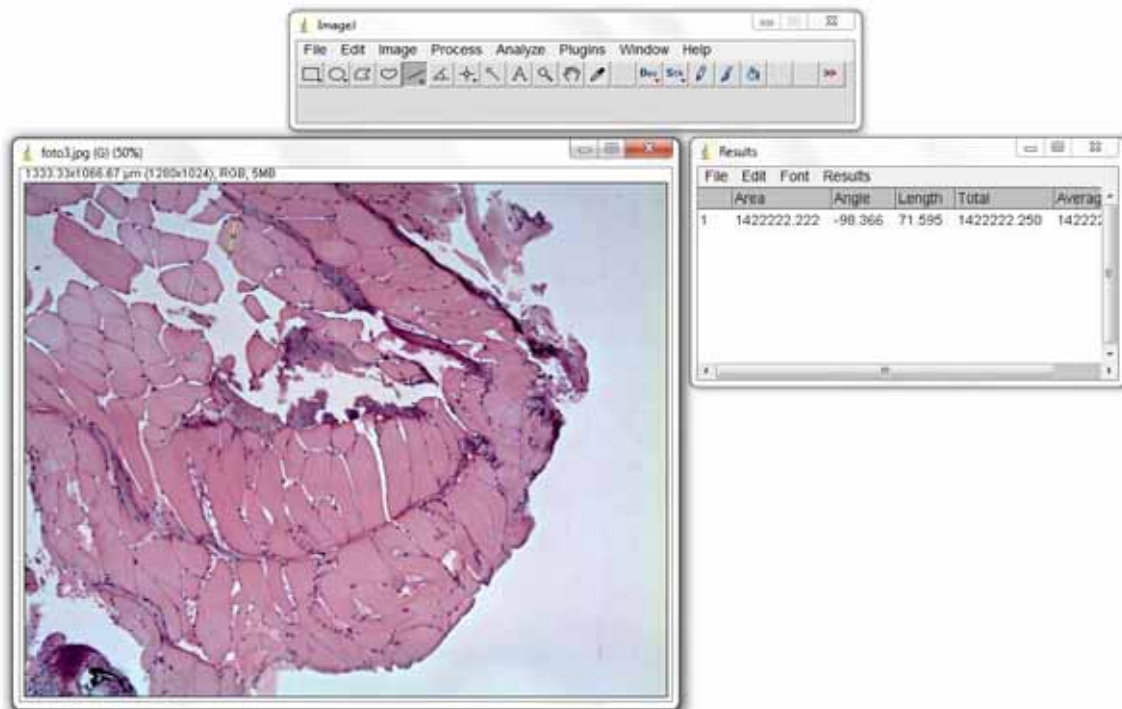


Figura 3: Layout do programa ImageJ durante a realização das medidas do diâmetro das fibras musculares

Os dados gerados pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioEstat 5.0. Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos grupos e posteriormente ao teste ANOVA/Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis/Dunn, para dados não paramétricos, para determinar a significância dos resultados.

4.4 - Análise quantitativa de colágeno

Nesta análise, os cinco cortes de cada indivíduo foram submetidos à técnica de Picrosírius Red, isto feito, cinco regiões foram fotografadas em cada corte e foi feita a quantificação do colágeno total do material. As fotos geradas de colágeno total, foram analisadas e quantificadas com o auxílio do programa ImageJ (figura 4).

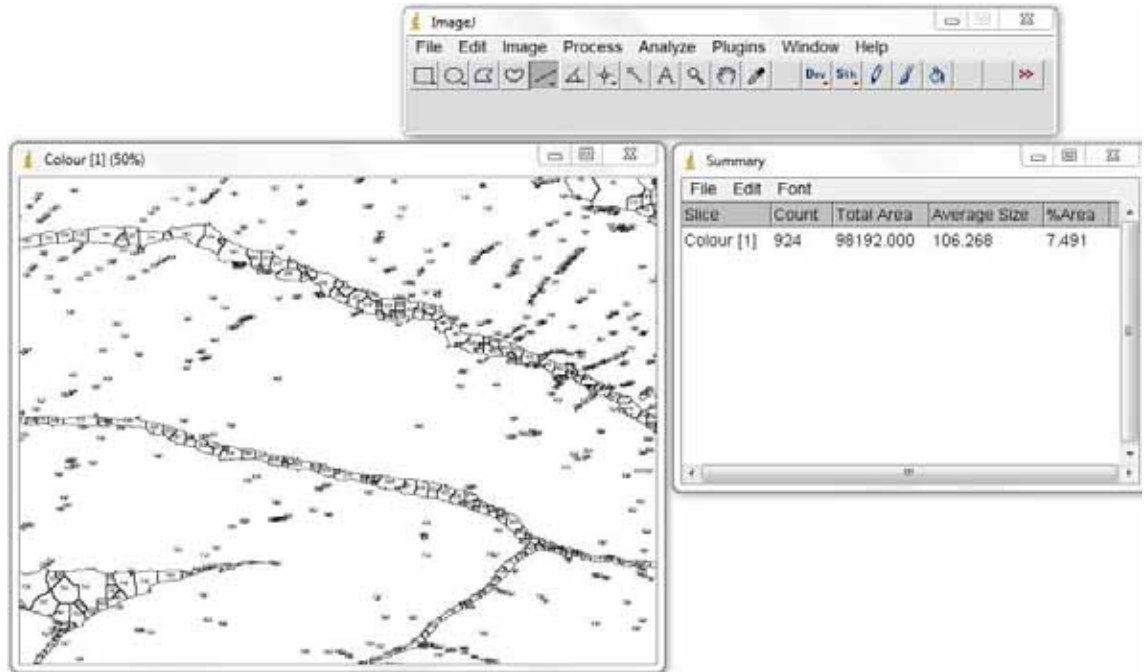


Figura 4: Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pelo colágeno total.

Os dados de área de colágeno total gerados pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioEstat 5.0. Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos grupos e posteriormente ao teste ANOVA/Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis/Dunn, para dados não paramétricos, para determinar a significância dos resultados.

4.5 - Análise da porcentagem de colágeno dos tipos I e III

De forma semelhante à análise anterior, cinco cortes de cada indivíduo foram submetidos à técnica de Picrosírius Red. Os cortes foram analisados ao microscópio sob luz polarizada. Foram tiradas duas fotos por corte: uma sob luz polarizada e a outra com campo claro para que posteriormente pudessem ser feitas comparações entre a área ocupada pelo colágeno total e as áreas ocupadas pelos colágenos do tipo I e III reveladas pela polarização. As fotos geradas foram analisadas e quantificadas com o auxílio do programa ImageJ (figura 5).

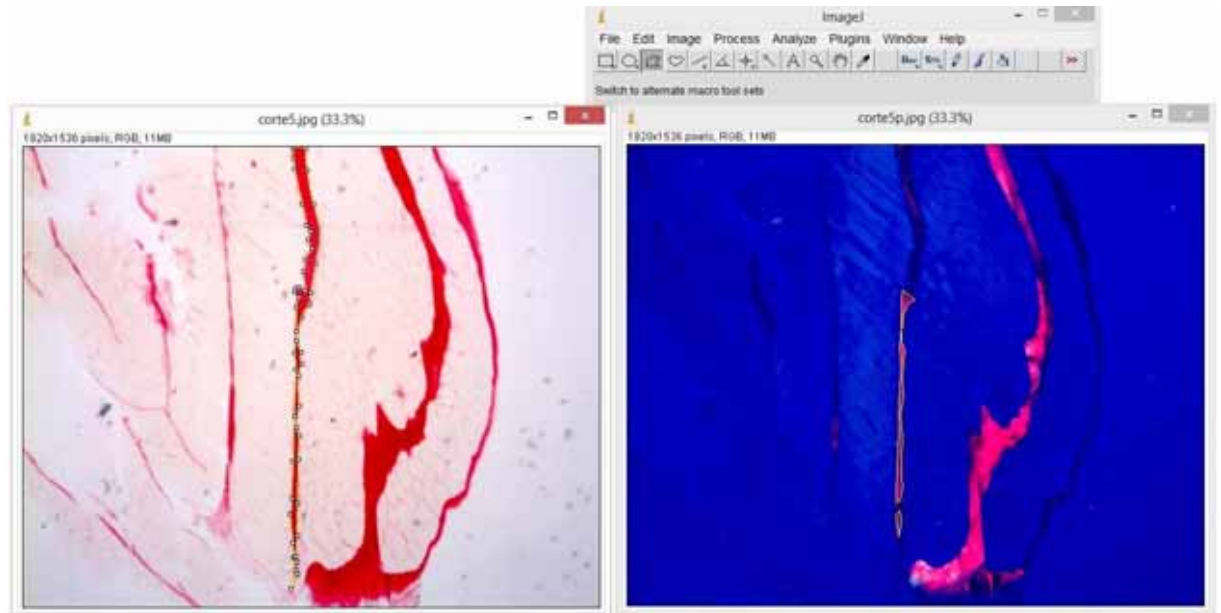


Figura 5: Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III e pelo colágeno total

Posteriormente foram calculadas as porcentagens dos colágenos tipo I e III nas regiões polarizadas.

Os dados de área de colágeno total gerados pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioEstat 5.0.

4.6 – Análise da área total ocupada pela lipofuscina

Cortes sem coloração foram analisados com o microscópio de fluorescência Olympus – BX51 e fotografados no software DP – Controller, sob o filtro de luz de 450 – 490nm, segundo Peixoto et al. (2002). As imagens obtidas foram então analisadas e quantificadas com o auxílio do programa ImageJ (figura 6).

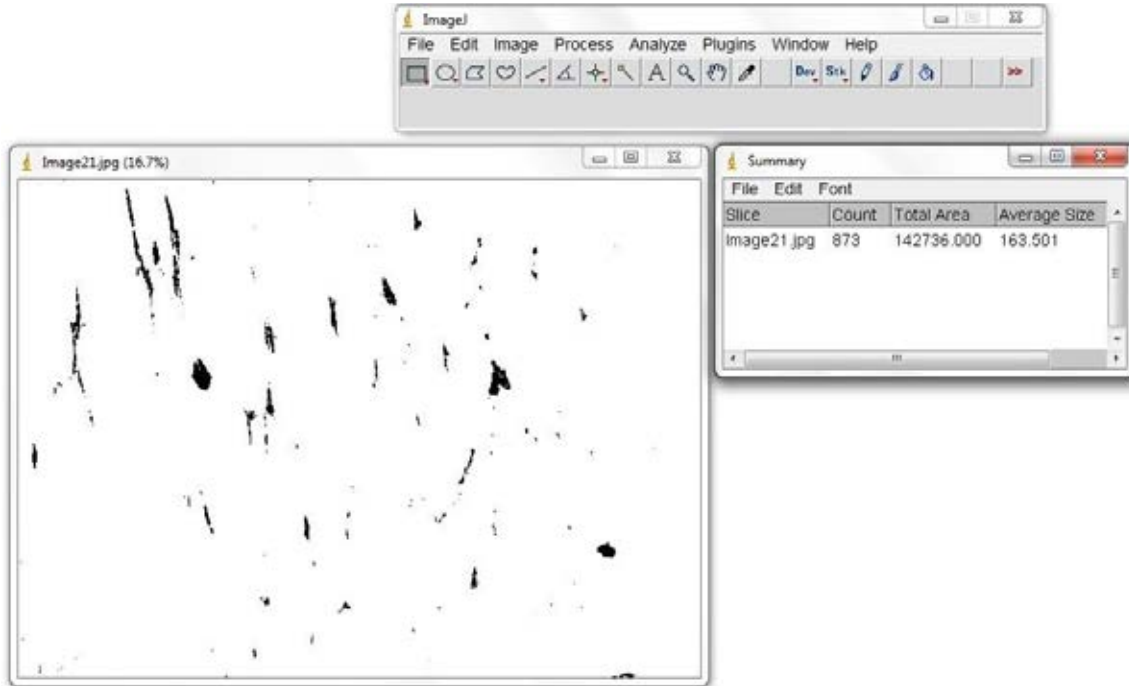


Figura 6: Layout do programa ImageJ durante a quantificação da área ocupada pela lipofuscina.

Os dados de área da lipofuscina gerados pelo programa, foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioEstat 5.0. Primeiramente, os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos grupos e posteriormente ao teste ANOVA/Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis/Dunn, para dados não paramétricos, para determinar a significância dos resultados.

5 - RESULTADOS

5.1 – Análise química da água utilizada no experimento

Na análise realizada da água utilizada neste experimento, obteve-se que comparados ao grupo Controle, os tratamentos 1 e 2 apresentaram pH mais alcalino, subindo de pH 5,39 no Controle para pH 6,04 no Detergente e pH 7,17 no Lago Azul. Essa diferença é explicada pela elevação na concentração de HCO_3^- presente nas amostras, que variou de $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$ no grupo Controle, a $4,9 \text{ mg.L}^{-1}$ no Detergente e $59,3 \text{ mg.L}^{-1}$ no Lago Azul.

O grupo Detergente apresentou elevações significativas quando comparado ao Grupo Controle e Lago Azul nas concentrações de Na ($20,1 \text{ mg.L}^{-1}$), e Ni ($0,066 \text{ mg.L}^{-1}$), e aumento na concentração de NO_2^- ($1,15 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação apenas ao grupo Controle. Ao passo que a

água do grupo Lago Azul apresentou elevação em relação ao grupo Controle e Detergente nas concentrações de F^- ($0,40 \text{ mg.L}^{-1}$), Cl^- (mg.L^{-1}) e Fe ($0,16 \text{ mg.L}^{-1}$), e aumento na concentração de NO_2^- ($0,86 \text{ mg.L}^{-1}$) em relação ao grupo Controle.

Por fim, com relação à concentração de LAS, na diluição de detergentes foi encontrada a concentração de $0,375 \text{ mg/L}$ de surfactante e na amostra de água do Lago Azul foi encontrada uma concentração de $0,33 \text{ mg/L}$ de surfactante.

5.2 - Análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio

Na análise estatística das fibras dos peixes que foram expostos aos poluentes durante o período de 7 dias (tempo 1), obteve-se que tanto as fibras do músculo caudal branco como as do músculo caudal vermelho e também as fibras do músculo peitoral branco e do peitoral vermelho (Tabela 1), não apresentaram diferenças significativas em relação à área ocupada pelo glicogênio com $p=0,3679$ no músculo caudal branco; $p=0,347$ no músculo peitoral branco e $p=0,1911$ no músculo caudal vermelho, para o teste de Kruskal-Wallis; $p=0,599$ para o teste ANOVA no músculo peitoral vermelho.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	12493,36	5037,358	20171,2	5094,898	22044,84	4841,761	28409,46	7095,205
	P2	13905,24	8547,093	20552,3	4712,81	24514,58	5139,359	32739,99	5519,662
	P3	11896,39	7262,259	22946,46	7015,998	17392,4	4704,461	46853,75	4470,246
	P4	16929,73	4831,917	25057,04	4464,126	15214,84	5001,665	31643,72	10515,56
	P5	19813	6632,524	25996,59	9979,039	30258,05	7945,489	29872,57	6224,7
	P6	15639	7183,663	21081,73	5797,129	28229,44	7839,518	42837,29	8543,778
Detergente	P1	30166,28	5204,784	34486,34	8237,445	37287,7	6427,06	30058,83	8934,641
	P2	31334,51	6182,863	40276,57	9487,32	29621,66	8122,122	35910,97	7502,61
	P3	3250,61	2121,472	16798,49	9276,978	18014,64	3790,835	35910,97	7502,61
	P4	6596,646	4007,081	33378,06	6368,429	21197,88	3244,35	35446,86	9139,86
	P5	24061,33	3164,855	44019,59	7155,426	36614,37	6753,446	35986,29	7859,914
	P6	26504,83	4030,105	20749,18	12011,65	41517,23	6138,464	35986,29	7859,914
Lago	P1	5274,663	7096,994	37977,84	6665,944	25441,74	13369,05	29058,08	5503,845
	P2	2654,938	3980,414	20241,76	7102,122	30350,35	6228,22	39620,62	3672,26
	P3	19302,28	6151,971	26552,63	5732,007	28327,54	5940,158	34062,74	10148,74
	P4	22519,45	5343,397	41232,37	8461,997	25906	5532,464	28072,26	3091,31
	P5	16317,22	8561,915	16954,26	8027,588	29822,33	6341,352	35042,34	4442,178
	P6	21527,97	7601,962	26860,44	5257,285	27060,93	2754,363	28691,46	6357,852

Tabela 1: Médias (μm^2) e desvios padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pelo glicogênio. (Tempo 1)

Na análise estatística das fibras dos peixes expostos aos poluentes durante o período de 30 dias (tempo 2), obteve-se que tanto as fibras do músculo caudal branco como as do músculo caudal vermelho e também as fibras do músculo peitoral branco e do peitoral vermelho (Tabela 2), não apresentaram diferenças significativas em relação à área ocupada pelo glicogênio com $p=0,2238$ no músculo caudal branco e $p=0,172$ no músculo caudal vermelho, para o teste de Kruskal-Wallis; $p=0,7095$ no músculo peitoral branco e $p=0,2803$ no músculo peitoral vermelho, para o teste ANOVA.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	409874,9	116817,8	674722,5	94880,98	316553,45	227878,9	531100,2	78638,91
	P2	393481,5	94208,57	657517,9	49496,35	853252	183845,9	669970,2	111533,6
	P3	1200918	338234,6	323000,37	124919,2	517055,5	171227,4	566826,76	108506,4
	P4	1383663	563198,9	606292,92	74117,94	484902,2	179792,3	444682,1	90610,19
	P5	1244642	282766,4	392926,8	75070,79	339404,2	57712,95	521214,8	74248,75
	P6	1352763	271870,8	430236	56853,97	406939,5	59454,44	448739,7	47967,44
Detergente	P1	696251,7	77866,13	883594,59	163977,95	546077,55	29435,52	449685,5	55625,48
	P2	605938,1	125150,6	788173,8	113362,1	563664,3	45166,13	395334,5	66832,4
	P3	626349,07	93485,32	344802,9	92711,56	480615,97	72567,73	563428,7	46352,55
	P4	507387,2	111654,1	380136,8	71486,15	473708,9	63442,33	452317,9	78345,62
	P5	129841,1	46223,76	623455,7	54334,5	490943,22	110086	398561,3	38458,41
	P6	126025,9	46264,67	573423,9	67543,8	548000,6	92074,31	461278,4	57259,93
Lago	P1	599636,7	133930,1	752094,8	259313,7	473451,65	59679,5177	481434,28	38458,41
	P2	517188,8	109377,2	845152	146384,4	468201,351	103795,059	531826,62	57259,93
	P3	646012,7	77179,51	450146,75	238722,01	486046,005	105753,506	372900,6	9228,693
	P4	519904,4	103041,9	449403,6	76639,74	404438,983	83575,744	453779,2	49999,09
	P5	674328,9	101417,5	546722,7	68657,48	540000,1	348371,8	653818,5	91736,37
	P6	652453,5	188354	436738,8	71978,76	470666,00	307235,1	722010,3	45032,42

Tabela 2: Médias (μm^2) e desvios padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pelo glicogênio. (Tempo 2)

5.3 - Análise do diâmetro das fibras musculares

Ao realizar a análise estatística das medidas do diâmetro das fibras musculares dos peixes expostos aos poluentes durante 7 dias (tempo 1), as fibras do músculo branco caudal foram submetidas ao teste ANOVA/Tukey. Nota-se que as medidas das fibras do grupo Controle (Tratamento 1) apresentaram diferença não significativa quando comparada ao grupo Detergente (Tratamento 2) e ao grupo Lago Azul (Tratamento 3).

As fibras do músculo branco peitoral também foram submetidas ao teste ANOVA/Tukey. As medidas destas para o grupo Controle apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo Detergente ($p < 0.05$) e ao grupo Lago Azul ($p < 0.01$). Houve um aumento no diâmetro das fibras do grupo Detergente em relação ao grupo Controle.

Com relação à musculatura vermelha caudal, as fibras do mesmo foram submetidas ao teste ANOVA e nenhuma das comparações mostrou diferença significativa. Entretanto, quando as fibras do músculo vermelho peitoral foram submetidas ao teste Kruskal-Wallis/Dunn constatou-se que essas fibras do grupo Controle apresentavam diferença significativa em relação ao grupo Detergente ($p < 0.05$), notando-se uma redução no diâmetro das fibras do grupo detergente em relação ao grupo Controle. Porém, as fibras do grupo Controle não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Lago Azul.

A tabela 3 mostra as médias (μm) e desvio padrão obtido na análise do diâmetro das fibras musculares.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	63,517	30,930	71,802	30,759	50,649	11,115	34,976	9,146
	P2	71,513	32,186	63,060	25,616	50,331	11,143	34,369	10,478
	P3	40,837	19,176	67,972	32,215	54,035	10,972	37,448	10,367
	P4	44,270	20,468	65,770	27,795	46,167	12,962	32,100	10,966
	P5	71,802	30,759	63,219	25,053	28,977	5,260	36,351	8,685
	P6	63,060	25,616	59,894	26,397	30,261	4,157	37,036	10,722
Detergente	P1	71,564	35,643	73,038	34,959	30,108	7,303	76,342	26,515
	P2	81,340	40,595	70,164	32,216	30,084	7,284	76,791	25,579
	P3	52,893	23,986	69,645	35,350	41,865	10,860	65,819	29,382
	P4	60,859	30,578	70,848	34,028	43,811	9,954	78,059	27,439
	P5	51,512	23,367	86,239	40,840	44,289	14,822	43,037	9,834
	P6	57,627	23,837	89,640	39,505	38,456	16,165	42,499	11,891
Lago	P1	48,133	21,784	87,082	18,102	45,095	12,311	45,898	12,924
	P2	50,925	20,965	83,229	19,331	38,970	10,609	42,068	9,638
	P3	48,390	20,718	92,005	18,499	35,135	8,491	46,051	12,092
	P4	46,152	20,298	94,172	18,007	34,379	7,679	38,900	10,721
	P5	42,853	20,592	92,413	19,030	40,358	11,362	60,086	13,136
	P6	39,115	18,748	96,598	17,201	33,125	9,792	62,670	12,258

Tabela 3: Médias (μm) e desvios padrão do diâmetro das fibras musculares. (Tempo 1)

Porém, nas análises estatísticas das fibras dos peixes que foram expostos aos poluentes durante o período de 30 dias (tempo 2), obteve-se que tanto as fibras do músculo caudal branco como as do músculo caudal vermelho e também as fibras do músculo peitoral branco e

do peitoral vermelho (Tabela 4), não apresentaram diferenças significativas em relação às médias das fibras com $p=0,5225$ para o teste Kruskal-Wallis no músculo caudal branco; $p=0,7834$ no músculo peitoral branco, $p=0,2558$ no músculo caudal vermelho e $p=0,7897$ no músculo peitoral vermelho, para o teste ANOVA.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	52,3033	14,8825	45,1387	8,4642	40,6847	15,6951	48,603	11,5263
	P2	60,5827	15,0554	47,7723	5,0254	40,9946	13,7694	76,8585	29,8189
	P3	56,047	15,3869	69,4255	22,4837	34,2579	8,1656	48,0155	13,5969
	P4	55,5009	21,0285	74,4223	21,1686	29,6057	7,5589	47,0577	12,1912
	P5	61,9537	8,7222	46,7839	13,1718	54,0222	14,2941	60,2398	21,2089
	P6	52,717	4,9952	44,3698	11,7755	53,3664	14,3085	46,8671	11,8051
Detergente	P1	36,326	12,1585	46,4393	7,5826	62,8947	17,5615	46,8711	14,305
	P2	50,7772	15,8487	48,5937	7,6532	62,4585	15,3703	46,325	14,6177
	P3	68,7836	20,1161	58,3783	19,1488	39,7827	10,6528	30,008	6,5146
	P4	69,6146	21,4003	82,9173	25,2351	51,1207	3,9813	28,6413	2,5422
	P5	76,425	18,1319	55,334	11,5937	28,0395	6,905	65,3537	2,2895
	P6	58,9033	3,2515	68,5147	9,4314	28,8762	7,8672	64,187	4,4201
Lago	P1	84,044	29,3893	81,4753	4,897	22,8853	5,7261	71,7534	30,6098
	P2	80,0757	26,4372	59,577	16,6029	25,977	2,8629	71,0023	30,7148
	P3	69,1527	27,1446	42,2653	12,6042	13,9383	2,7449	21,84075	13,5029
	P4	78,7247	25,0808	51,7347	8,6752	16,91	0,7267	12,14897	6,7312
	P5	42,832	6,0468	60,6037	7,8355	52,1961	19,5972	51,756	23,2119
	P6	31,8403	7,6007	54,4277	15,0796	55,586	19,9535	71,372	25,6921

Tabela 4: Médias (μm) e desvios padrão do diâmetro das fibras musculares. (Tempo 2)

5.4 - Análise quantitativa de colágeno

Na análise estatística das fibras dos peixes que foram expostos aos poluentes durante o período de 7 dias (tempo 1), obteve-se que tanto as fibras do músculo caudal branco como as do músculo caudal vermelho e também as fibras do músculo peitoral branco e do peitoral vermelho (Tabela 5), não apresentaram diferenças significativas em relação à área ocupada pelo colágeno com $p=0,0947$ no músculo caudal branco, $p=0,587$ no músculo peitoral branco, $p=0,06$ no músculo caudal vermelho, para o teste de Kruskal-Wallis; $p=0,0319$ para o teste Kruskal-Wallis/Dunn no músculo peitoral vermelho.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	14876,92	14544,63	2083,466	1181,834	2323,307	3521,242	24916,33	8550,199
	P2	25098,83	14400,76	8983,066	11607,13	9469,391	5987,18	13819,85	7115,18
	P3	3822,847	2997,039	49302,18	61576,8	76888,26	37677,39	126297,6	92949,49
	P4	7446,239	3355,506	47267,6	67856,02	44107,95	66067,45	9134,782	4678,67
	P5	85227,53	87057,72	4472,137	2622,22	30037,82	33481,63	158304,6	162194,1
	P6	63917,55	54573,62	5942,094	3296,13	9564,513	6748,068	74042,08	66230,56
Detergente	P1	5342,58	2369,403	5342,58	2369,403	5342,58	2369,40	26585,1	2552,72
	P2	6937,506	2929,043	6937,506	2929,043	6937,506	2929,043	20695,7	16042,74
	P3	24008,98	3137,592	24008,98	3137,592	24008,98	3137,592	36722,4	6433,35
	P4	3249,637	737,7292	3249,637	737,7292	3249,637	737,73	45363,38	12645,56
	P5	4021,593	705,8365	4021,593	705,8365	4021,593	705,8365	47541,27	7650,762
	P6	6428,331	2383,423	6428,331	2383,423	6428,331	2383,423	54755,55	25684,65
Lago	P1	3799,819	2813,13	7566,957	12632,01	29605,70	45440,75	1869,841	824,2077
	P2	11305,75	10570,70	7566,957	12632,01	19372,23	21632,09	2925,036	1127,109
	P3	13509,05	3254,99	2155,74	1350,284	13509,05	3254,986	24616,24	22299,35
	P4	8501,524	2689,50	4597,28	3941,961	8501,524	2689,503	7293,549	3879,43
	P5	2625,677	719,6648	5592,518	1136,32	53328,55	25782,78	26306,55	31151,01
	P6	2357,406	596,4714	2235,626	220,3978	36664,63	26654,19	12216,14	5036,973

Tabela 5: Médias (μm^2) e desvios padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pelo colágeno. (Tempo 1)

De forma semelhante, as análises estatísticas da área ocupada pelo colágeno nas fibras dos peixes que foram expostos aos poluentes durante o período de 30 dias (tempo 2), também não resultaram em diferenças significativas, sendo que tanto as fibras do músculo caudal branco como as do músculo caudal vermelho e também as fibras do músculo peitoral branco e do peitoral vermelho (Tabela 6), não apresentaram diferenças significativas em relação à área ocupada pelo colágeno com $p=0,2636$ para o teste Kruskal-Wallis no músculo caudal branco; $p=0,5841$ no músculo peitoral branco, $p=0,0616$ no músculo caudal vermelho, $p=0,1504$ no músculo peitoral vermelho para o teste ANOVA.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	70718,86	50075,8	94269,39	132623	51227,3	13647,52	105852,9	45810,52
	P2	54027,69	35861,67	76190,65	119094	45598,04	15033,9	51889,42	32474,72
	P3	92561	61727,34	15363,34	5604,17	34914,80	23539,42	14224,33	7608,258
	P4	131803,7	72888,04	20641,95	9474,81	24758,70	18973,11	19247,64	4006,694
	P5	90216,02	61108,68	29656,96	7401,8	78804,23	53018,33	21318,82	15259,68
	P6	60610,97	33554,44	47573,24	22330,7	76679,04	54383,36	26892,63	11111,94
Detergente	P1	117868,77	57494,62	52362,67	11751,9	190476,5	89167,45	11547,67	6323,374
	P2	77311,6	48099,6	69349	24480,5	153027,8	93818,09	13316,53	10327,72
	P3	26010,61	15846,68	76813,15	41612,9	104989,8	37192,50	29752,6	11567,62
	P4	21057,79	7183,445	30752,67	33554,8	114439,2	60344,64	18901,54	10901,01
	P5	50340,93	46274,29	6578,776	1999,12	23177,9	10411,31	15352,65	10817,24
	P6	46177,3	16599,92	19436,06	4795,08	56525,25	7892,031	7642,325	3420,632
Lago	P1	35332,03	4392,13	39294	14402	108023,4	26615,09	11554	7598,357
	P2	28081,62	2785,72	54898,33	5150,48	71561,31	49609,08	59398	4025,169
	P3	217979,67	97070,87	21005	14737,5	22298,67	11666,43	40869,67	11172,52
	P4	173577,3	69356,43	24094,67	3784,35	15574	6420,548	20119,67	6551,796
	P5	51045	15212,41	8963,333	3134,22	44157,33	28139,16	16351	5286,953
	P6	29687	17718,75	15558,67	5576,39	53870,33	18107,66	8415,667	3798,816

Tabela 6: Médias (μm^2) e desvios padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pelo colágeno. (Tempo 2)

5.5 - Análise da área total ocupada pelos colágenos dos tipos I e III

Na análise estatística da área ocupada pelo colágeno do tipo I nas fibras musculares dos peixes expostos aos poluentes durante 7 dias (tempo 1), as fibras do músculo branco caudal foram submetidas ao teste ANOVA/Tukey. Nota-se que as fibras do grupo Controle (Tratamento 1) apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparadas ao grupo Detergente (Tratamento 2) e ao grupo Lago Azul (Tratamento 3), constatando-se a diminuição na área ocupada por este colágeno nas fibras dos grupos Detergente e Lago Azul em relação ao grupo Controle.

As fibras do músculo branco peitoral foram submetidas ao mesmo teste estatístico e a porcentagem de área ocupada pelo colágeno do tipo I para o grupo Controle apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo Detergente ($p < 0,05$) e ao grupo Lago Azul ($p < 0,01$). Novamente, houve diminuição da área ocupada por este colágeno nas fibras dos grupos Detergente e Lago Azul em relação ao grupo Controle.

Com relação à musculatura vermelha caudal, após análise estatística obteve-se que nenhuma das comparações mostrou diferença significativa ($p = 0,0572$). Entretanto, na análise

das fibras do músculo vermelho peitoral constatou-se que o grupo Controle apresentou diferença significativa em relação ao grupo Lago Azul ($p < 0,01$), notando-se uma redução na área ocupada pelo colágeno do tipo I nas fibras do grupo Lago Azul em relação ao grupo Controle. Porém, as fibras do grupo Controle não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Detergente.

A tabela 7 mostra as médias (%) e desvios padrão obtidos na análise das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo I.

	Colágeno Tipo I							
	Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	24,4508	16,7442	28,0195	23,1172	13,0853	12,5217	26,0321	20,439
Detergente	14,35	12,6034	15,6084	10,7126	6,5942	12,7653	17,9236	17,3068
Lago Azul	7,9174	6,5406	9,0034	11,524	12,1386	8,529	11,2377	13,7135

Tabela 7: Médias (%) e desvios padrão das porcentagens das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo I. (Tempo 1)

Já na análise estatística da área ocupada pelos colágenos do tipo III, com relação às fibras do músculo branco caudal, a partir do teste ANOVA/Tukey constatou-se que não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos ($p = 0,736$).

Nas fibras do músculo branco peitoral a porcentagem de área ocupada pelo colágeno do tipo III no grupo Controle apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo Detergente ($p < 0,01$) e ao grupo Lago Azul ($p < 0,01$). Nota-se que houve uma diminuição da área ocupada por este colágeno nas fibras dos grupos Detergente e Lago Azul em relação ao grupo Controle.

Com relação à musculatura vermelha caudal, semelhantemente ao que ocorreu na análise do colágeno do tipo I nesta musculatura, nenhuma das comparações mostrou diferença significativa ($p = 0,0709$). Entretanto, na análise das fibras do músculo vermelho peitoral, constatou-se a ausência de colágeno do tipo III no grupo Controle. Sendo assim, nas análises estatísticas, obteve-se diferença significativa em relação ao grupo Lago Azul ($p < 0,01$), notando-se um aumento na área ocupada pelo colágeno do tipo III nas fibras do grupo Lago Azul em relação ao grupo Controle. Porém, as fibras do grupo Controle não apresentaram diferença significativa em relação ao grupo Detergente.

A tabela 8 mostra as médias (%) e desvios padrão obtidos na análise das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo III.

	Colágeno Tipo III							
	Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	4,296	8,5168	18,7044	32,9271	3,9095	10,0187	0	0
Detergente	3,5166	10,4783	0,4674	1,9825	9,1158	22,3458	1,4526	3,665
Lago Azul	2,5843	6,5666	1,1276	2,1898	0,7671	2,3402	23,3235	33,2283

Tabela 8: Médias (%) e desvios padrão das porcentagens das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo III. (Tempo 1)

Na análise estatística da área ocupada pelos colágenos do tipo I nas fibras musculares dos peixes expostos aos poluentes durante 30 dias (tempo 2), as fibras do músculo branco caudal foram submetidas ao teste ANOVA/Tukey. Da mesma forma que no tempo 1, no tempo 2 observou-se que as fibras do grupo Controle (Tratamento 1) apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) quando comparadas ao grupo Detergente (Tratamento 2) e ao grupo Lago Azul (Tratamento 3), constatando-se uma redução na área ocupada por este colágeno nas fibras dos grupos Detergente e Lago Azul em relação ao grupo Controle.

No caso das fibras do músculo branco peitoral, distintamente do ocorrido no tempo 1, nenhum dos grupos apresentou diferença significativa entre si ($p = 0,2769$). Com relação à musculatura vermelha caudal, o grupo Controle apresentou diferença significativa em relação ao grupo Detergente ($p < 0,05$), mas quando comparado ao grupo Lago Azul, não houve diferença significativa. Constatou-se uma redução da área ocupada pelo colágeno do tipo I no grupo Detergente em relação ao grupo Controle. De forma semelhante ao obtido na análise do tempo 1, constatou-se que nas fibras do músculo vermelho peitoral, o grupo Controle apresentou diferença significativa em relação ao grupo Lago Azul ($p < 0,01$) e não significativa no grupo Detergente. Nota-se a redução da área ocupada pelo colágeno do tipo I nas fibras do grupo Lago Azul em relação ao grupo Controle.

A tabela 9 mostra as médias (%) e desvios padrão obtidos na análise das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo I.

	Colágeno Tipo I							
	Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	30,2329	17,895	26,767	28,9417	23,3833	25,5656	24,751	19,0055
Detergente	13,1509	14,1353	17,9722	16,4387	8,5343	6,9578	16,2132	18,7851
Lago Azul	15,1849	10,6068	19,9618	19,0851	24,3329	26,7483	8,8072	9,1565

Tabela 9: Médias (%) e desvios padrão das porcentagens das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo I. (Tempo 2)

A análise estatística da área ocupada pelos colágenos do tipo III no tempo 2, com relação às fibras das musculaturas branca e vermelha caudal, obteve-se resultados semelhantes aos do tempo 1, no qual não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos ($p=0,1041$ e $p=0,0508$, respectivamente). Nas fibras do músculo branco peitoral, também não houve diferença significativa entre nenhum dos grupos, diferindo dos resultados do tempo 1 ($p=0,5879$). Nas fibras do músculo vermelho peitoral, o grupo Controle não apresentou diferença significativa em relação aos tratamentos 1 e 2.

A tabela 10 mostra as médias (%) e desvios padrão obtidos na análise das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo III.

	Colágeno Tipo III							
	Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	6,3121	15,2313	3,1163	6,4877	1,575	3,1524	7,1045	14,9529
Detergente	1,1231	2,746	5,2435	10,4322	8,08	15,2692	6,0753	11,6016
Lago Azul	1,815	8,4189	4,8735	7,9232	8,6083	14,458	3,96	7,0606

Tabela 10: Médias (%) e desvios padrão das porcentagens das áreas ocupadas pelo colágeno do tipo III. (Tempo 2)

5.6 - Análise da área total ocupada pela lipofuscina

Ao analisar estatisticamente a área ocupada pela lipofuscina nas fibras musculares dos peixes expostos aos poluentes durante 7 dias (tempo 1), as fibras do músculo branco caudal foram submetidas ao teste ANOVA/Tukey para dados paramétricos e Kruskal-Wallis/Dunn, para os não paramétricos. Os resultados estatísticos evidenciaram que não houve diferença

significativa entre as musculaturas caudal e peitoral branca e peitoral vermelha com $p=0,8689$ para o teste ANOVA no músculo caudal branco; $p=0,5808$ para o teste ANOVA no músculo peitoral branco; $p=0,647$ para o teste ANOVA no músculo peitoral vermelho.

As únicas fibras a apresentarem diferença significativa foram as da musculatura caudal vermelha, na qual se obteve uma diferença significativa ($p<0,05$) entre os tratamentos 1 e 2, constatando-se um aumento na área ocupada pela lipofuscina no grupo Detergente em relação ao grupo Controle.

A tabela 7 mostra as médias (μm^2) e desvio padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pela lipofuscina.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	32126,24	15804,28	32002,12	14241,88	295367	139311,3	59952	30682,31
	P2	18424,87	10885,44	23488,31	21121,39	362779,5	187439,7	60756,74	26741,75
	P3	66403,09	51439,95	60320,79	57127,8	133679,9	58139,67	55195,85	45708,16
	P4	21771,48	9082,887	60320,79	57127,8	127634	43525,24	57991,98	45637,43
	P5	96615,57	86808,55	15001,93	8999,66	158353,1	53894,63	210871,4	101381,5
	P6	60444,79	18568,04	31212,12	27868,65	172518,9	45351,75	166077,2	66432,22
Detergente	P1	17011,86	13214,93	38700,71	49288,99	8431,754	11641,59	28626,87	17088,96
	P2	10564,66	9195,332	17337,49	22559,78	17134,49	20956,74	74761,79	111877,4
	P3	129387,3	87382,93	8733,217	8723,215	33060,39	11725,44	133469,1	77599,99
	P4	43800,94	37375,7	45648,21	95543,8	32931,42	11402,19	89768,51	39123,07
	P5	24636,52	40201,16	65146,78	41419,24	37636,48	51407,27	89008,35	42353,26
	P6	16604,69	18678,05	73529,13	28339,02	34056,06	53666,64	60706,87	47314,97
Lago	P1	71551,04	49481,34	19853,8	10596,77	132225,7	46982,2	110131	68182,77
	P2	72213,15	39762,5	13467,42	4708,978	132106,9	59412,51	132420,3	80681,99
	P3	47714,46	69367,44	110103,1	137748,3	184457,5	103814,3	18472,58	110305,5
	P4	95129,77	87320,77	103181,8	76215,58	105636,7	57673,63	72875,85	52583,28
	P5	6066,355	7916,212	81995,54	109942,7	31306	27464,26	58349,16	43816,25
	P6	13840,36	13146,37	32076,24	14678,64	53092,13	30371,06	67328,08	111143,2

Tabela 7: Médias (μm^2) e desvios padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pela lipofuscina. (Tempo 1)

Entretanto, ao serem analisadas estatisticamente as fibras dos peixes que foram expostos aos poluentes durante o período de 30 dias (tempo 2), obteve-se que a lipofuscina presente tanto as fibras do músculo caudal branco como as do músculo caudal vermelho e também as fibras do músculo peitoral branco e do peitoral vermelho (Tabela 8), não

apresentaram diferenças significativas em relação às médias das fibras com $p=0,0947$ no músculo caudal branco, $p=0,587$ no músculo peitoral branco e $p=0,06$ no músculo caudal vermelho para o teste de Kruskal-Wallis; $p=0,0319$ para o teste Kruskal-Wallis/Dunn no músculo peitoral vermelho.

		Caudal Branco		Peitoral Branco		Caudal Vermelho		Peitoral Vermelho	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Controle	P1	14876,92	14544,63	2083,466	1181,834	2323,307	3521,242	24916,33	8550,199
	P2	25098,83	14400,76	8983,066	11607,13	9469,391	5987,18	13819,85	7115,18
	P3	3822,847	2997,039	49302,18	61576,8	76888,26	37677,39	126297,6	92949,49
	P4	7446,239	3355,506	47267,6	67856,02	44107,95	66067,45	9134,782	4678,67
	P5	85227,53	87057,72	4472,137	2622,22	30037,82	33481,63	158304,6	162194,1
	P6	63917,55	54573,62	5942,094	3296,13	9564,513	6748,068	74042,08	66230,56
Detergente	P1	5342,58	2369,403	5342,58	2369,403	5342,58	2369,40	26585,1	2552,72
	P2	6937,506	2929,043	6937,506	2929,043	6937,506	2929,043	20695,7	16042,74
	P3	24008,98	3137,592	24008,98	3137,592	24008,98	3137,592	36722,4	6433,35
	P4	3249,637	737,7292	3249,637	737,7292	3249,637	737,73	45363,38	12645,56
	P5	4021,593	705,8365	4021,593	705,8365	4021,593	705,8365	47541,27	7650,762
	P6	6428,331	2383,423	6428,331	2383,423	6428,331	2383,423	54755,55	25684,65
Lago	P1	3799,819	2813,13	7566,957	12632,01	29605,70	45440,75	1869,841	824,2077
	P2	11305,75	10570,70	7566,957	12632,01	19372,23	21632,09	2925,036	1127,109
	P3	13509,05	3254,99	2155,74	1350,284	13509,05	3254,986	24616,24	22299,35
	P4	8501,524	2689,50	4597,28	3941,961	8501,524	2689,503	7293,549	3879,43
	P5	2625,677	719,6648	5592,518	1136,32	53328,55	25782,78	26306,55	31151,01
	P6	2357,406	596,4714	2235,626	220,3978	36664,63	26654,19	12216,14	5036,973

Tabela 8: Médias (μm^2) e desvios padrão obtidos da quantificação da área total ocupada pela lipofuscina. (Tempo 2)

6 - DISCUSSÃO

Para Barillet et al. (2010), análises morfométricas do tecido muscular podem constituir um indicador confiável de toxicidade de urânio. Da mesma forma, esperava-se que o mesmo fosse verdade com relação ao uso das análises morfométricas das fibras musculares como indicadores da toxicidade dos detergentes e dos poluentes presentes na água do Lago Azul e os efeitos desta sobre esse tecido. Tal fato pareceu ser consistente na primeira parte do experimento, visto que algumas pequenas diferenças foram identificadas em nossas amostras com sete dias de tratamento.

Lesões musculares constituem marcadores potencialmente induzíveis de contaminação ambiental. Traços degenerativos tais como atrofia muscular, miofibrilas quebradas, núcleo do sarcolema e retículo sarcoplasmático, inchados têm sido descritos como sintomas de exposição a contaminantes ambientais tais como pesticidas e metais (BARILLET et al., 2010). Sendo assim, as variâncias significativas encontradas nas medidas das fibras musculares sete dias de exposição poderiam indicar uma possível dilatação destas em virtude dos poluentes presentes na água como pode ser observado nos dados da musculatura branca peitoral, por exemplo.

Segundo Almeida et al. (2001), não foram observadas alterações no conteúdo total das proteínas do fígado e dos músculos branco e vermelho com a exposição do peixe (*Oreochromis niloticus*) ao cádmio, assim como não foram observadas alterações no glicogênio presente no músculo vermelho. Resultado semelhante foi obtido neste trabalho com a análise estatística realizada para a quantificação do glicogênio presente nas fibras musculares, pois não se obteve nenhum resultado significativo em nenhum dos tempos de exposição aos poluentes. Porém, diferentemente do observado nestes resultados, a quantidade de glicogênio aumentou no músculo branco com a exposição ao cádmio.

Mesmo exposições muito baixas aos poluentes podem estar associadas a vários efeitos biológicos tais como mudanças na atividade de algumas enzimas e nos combustíveis metabólicos (LAUWERYS et al., 1995; PETERS & LIVINGSTONE, 1996 apud ALMEIDA et al., 2001). Sendo assim, era esperado que nas presentes amostras fossem obtidos resultados significativos com a análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio, entretanto, tal não foi o caso.

De acordo com Sato et al. (1991), foi demonstrada a presença de colágeno dos tipos I e V em diversos tipo de peixes porém, Montero et al. (1990) detectou somente o colágeno do tipo I na musculatura de *Salmo irideus*. O colágeno é um dos principais constituintes dos tecidos conjuntivo intramusculares dos peixes e possui um importante papel na textura da carne destes animais (SATO et al., 1986; HATAE et al., 1986 apud SATO et al., 1991). Ainda, de acordo com Sato et al. (1991), a degradação do tecido conjuntivo intramuscular tem como consequência o amolecimento do músculo do peixe. Sendo assim, alterações no colágeno presente na musculatura podem trazer sérias implicações ao animal. Nas estatísticas realizadas não foram encontradas alterações significativas na área ocupada pelo colágeno total em presença dos poluentes. Porém, diferentemente do caso de *Salmo irideus*, na análise da área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III, foram encontrados ambos os tipos de colágeno

em *Astyanax altiparanae*. Além disso, resultados significativos foram obtidos tanto no tempo 1 quanto no tempo 2.

Nos ossos, o colágeno do tipo I é o constituinte mais abundante, embora também hajam colágenos dos tipos III e V em menores quantidades (SAITO et al., 2009). De maneira semelhante, no caso da musculatura, constatou-se que entre os colágenos dos tipos I e III, o colágeno do tipo I era notavelmente mais abundante tanto no músculo vermelho quanto no branco.

Segundo Tothro et al. (1986), estudos feitos com *Corollospora marítima* mostraram que a lipofuscina pode ser considerada indicadora de estresse ambiental, uma vez que a produção desta aumenta proporcionalmente com a poluição marítima por metais. Resultado semelhante foi obtido no presente experimento (tempo 1) com a análise da musculatura caudal vermelha, na qual houve um aumento na área ocupada pela lipofuscina no grupo Detergente que pode estar relacionado à presença deste poluente na água. Porém, nos animais expostos aos poluentes por 30 dias, ao contrário do que era esperado, não houve resultados significativos.

De acordo com o demonstrado por Martinelli et al. (1990), a acumulação de lipofuscina em situações de hipóxia ocorre também em humanos, assim como a diminuição no tamanho das fibras musculares.

7 - CONCLUSÕES

As musculaturas analisadas de *A. altiparanae* sofreram alterações em virtude da exposição dos indivíduos aos poluentes presentes nos tratamentos aos quais os espécimes foram submetidos, pois:

1. os testes realizados mostraram alterações morfológicas nas musculaturas: branca e vermelha, caudal e peitoral, no que concerne o diâmetro das fibras musculares.
2. encontrou-se diferenças significativas na área ocupada pelos colágenos dos tipos I e III entre o grupo Controle e os tratamentos 1 e 2.
3. a análise da área total ocupada pela lipofuscina sugere o envelhecimento precoce dos organismos analisados.

8 – REFERÊNCIAS

- ALBERTS B.; JOHNSON A.; LEWIS J.; RAFF M.; ROBERTS K.; WALTER P. Biologia Molecular da Célula. 4ª Edição. São Paulo: Artmed, 2006. 1463p.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. Química orgânica. Tradução de R. B. Alencastro; J. S. Peixoto; L. R. N. Pinho. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978.
- ALMEIDA, J. A.; DINIZ, Y. S.; MARQUES, S. F. G.; FAINE, L. A.; RIBAS, B. O.; BURNEIKO, R. C.; NOVELLI, E. L. B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environment International v. 27 p. 673–679, 2002.
- ALTRINGHAM, J. D.; ELLERBY D. J. Fish swimming: Patterns in muscle function. The Journal of Experimental Biology. 202. Great Britain, p. 3397-3403, 1999.
- ARKING, R. Biologia do Envelhecimento. 2ª Edição. Tradução de I. F. Afonso. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2008. 570 p.
- BARILLET, S.; LARNOA, V.; FLORIANI, M.; DEVAUXB, A.; ADAM-GUILLERMINA, C. Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. Aquatic Toxicology v. 100 p. 295–302, 2010.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco). Brasília: CODEVASF, 1988.
- CARANI, F. R.; AGUIAR, D.H.; de ALMEIDA F. L. A.; GONÇALVES. H. S.; PADOVANI, C. R.; SILVA, M. D. P. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu *Arapaima gigas* Cuvier, 1817 (Teleostei, Arapaimidae). Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, v. 30, no. 2, p. 205-211, 2008.
- GODOY, M. P. Peixes do Brasil. Subordem Characidae. Ed. Franciscana. São Paulo, v.4, p. 847, 1975.
- GOMIEIRO, L.M.; BRAGA, F.M.S. O lambari *Astyanax altiparanae* (Characidae) pode ser um dispersor de sementes? Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, v.25, no. 2, p. 353-360, 2003.
- HIBIYA, T. An Atlas of Fish Histology – Normal and Pathological Features. Stuttgart-Hohenheim: Gustav Fischer Verlag, 1982. 147 p.
- HOPPELER, H.; VOGT, M. Muscle tissue adaptations to hypoxia. The Journal of Experimental Biology. Great Britain, v. 204, p. 3133–3139, 2001.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia Básica 11ª Edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008. 542 p.

KALDOR G.; DIBATTISTA W. J. Aging in muscle (Aging v. 6). New York: Raven Press, 1978. 234 p.

MARTINELLI, M.; WINTERHALDER, R.; CERRETELLI, P.; HOWALD, H.; HOPPELER, H. Muscle lipofuscin content and satellite cell volume is increased after high altitude exposure in humans. Experientia v.46, 1990.

MUMFORD S.; HEIDEL J.; SMITH C.; MORRISON J.; MACCONNELL B.; BLAZER V. Fish Histology and Histopathology. 2007. 357 p.

NAG A. C. Ultrastructure and adenosine triphosphatase activity of red and white muscle fibers of the caudal region of a fish, *Salmo gairdneri*. The Journal of Cell Biology. v. 55 no. 1, p. 42-57, 1972.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambaris do gênero *Astyanax* Baird e Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. Rev. Brasil. Biol., Rio de Janeiro, v. 35, n. 4, p. 775-798, 1975.

PAULETE, J.; BEÇAK, W. Técnicas de Citologia e Histologia. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976. 2 Vols.

PEARSE, A.G.E. Applied histochemistry of simple and glycosylated proteins. In: Histochemistry, Theoretical and Applied (Pearse AGE, ed). Vol. 2. Edinburgh: Churchill Livingstone, 538–610, 1985.

POUGH, H. F.; JANIS C. M.; HEISTER J. B. A Vida dos Vertebrados. Tradução de A. M. Souza; P. Auricchio. 4ª Edição. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 2008. 684 p.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. Journal of cell Biology, v. 17 p.208-212. 1963.

SAITO, M.; MARUMO, K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. Osteoporos Int v. 21, p. 195–214, 2010.

SANTOS V. B. dos. Aspectos morfológicos da musculatura lateral dos peixes. B. Inst. Pesca, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 127 – 135, 2007.

SATO, K.; OHASHI, C.; OHTSUKI, K.; KAWABATA, M. Type V Collagen in Trout (*Salmo gairdneri*) Muscle and Its Solubility Change during Chilled Storage of Muscle. J. Agric. Food Chem. v. 39, p.1222-1225, 1991.

SATO, K.; YOSHINAKA, R.; ITOH, Y.; SATO, M. Molecular species of collagen in the intramuscular connective tissue of fish. Comp. Biochem. Physiol. Great Britain, v. 92B, n. 1, p. 87-91, 1989.

SCHMIDT-NIELSEN, K. Fisiologia Animal – Adaptação e Meio Ambiente. Tradução de T. Oppido. 5ª Edição. São Paulo: Livraria Santos Editora, 2010. 607 p.

SCHNEIDER E.; ROWE E. L. Handbook of the Biology of Aging. 3ª Edição. San Diego: Academic Press, 1990. 489 p.

SUAREZ , M. D.; ABAD, M.; RUIZ-CARA, T.; ESTRADA, J. D.; GARCÍA-GALLEGO, M. Changes in muscle collagen content during post mortem storage of farmed sea bream (*Sparus aurata*): influence on textural properties. Aquaculture International. v. 13, p. 315–325, 2005.

SUZUKI T.; TOSHIYUKI H.; SUYAMA M. Free imidazole compounds in white and dark muscles of migratory marine fish. Comp. Biochem. Physiol. Great Britain, v. 87B, n. 3, p. 615-619, 1987.

TOTHRO, E. A.; CUOMO, V.; PISANTI, F. A. Influence of environmental stress on lipofuscin production. Arch. Gerontol. Geriatr. v.5, p. 343-349, 1986.

VIDELER, J. J. Fish Swimming. London: Chapman & Hall, 1993. 284 p.

WARDLE, C. S.; VIDELER J. J.; ALTRINGHAM J. D. Review tuning in to fish swimming waves: body form, swimming mode and muscle function. The Journal of Experimental Biology. Great Britain, p. 1629-1636, 1995.