

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP

Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae)

Marcelo Gustavo Paulino

São Carlos
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS - UFSCar/UNESP

Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae)

Marcelo Gustavo Paulino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências fisiológicas.

São Carlos
2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P328ee

Paulino, Marcelo Gustavo.

Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatã, *Prochilodus lineatus* (Teleósteo, Prochilodontidae) / Marcelo Gustavo Paulino. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
98 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Peixe - fisiologia. 2. Brânquias. 3. Atrazina. 4. *Prochilodus lineatus*. 5. Células cloreto. 6. Histopatologia. I. Título.

CDD: 597.01 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Dissertação de Mestrado de Marcelo Gustavo Paulino

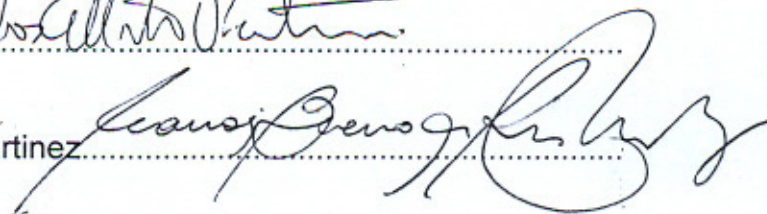
Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes.....



Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini.....



Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez.....



*“O valor das coisas não está no tempo que
elas duram, mas na intensidade com que
acontecem. Por isso, existem momentos
inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis”
(Fernando Pessoa)*

Dedico:

Aos meus pais, pela oportunidade e incentivo. Pelo exemplo de vida e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus.

À minha família, pela compreensão, incentivo e por acreditarem nos meus planos de vida.

À prof^a Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela amizade, confiança, orientação, oportunidades, ensinamentos e exemplo profissional.

À banca examinadora: Profa. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez e Dr. Carlos Vicentini.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

À Estação de Hidrologia e Piscicultura de Furnas - MG, pela obtenção dos curimbatás.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro.

À Dra. Marise Margareth Sakuragui por tudo que me ensinou e por toda ajuda. Sobretudo agradeço também pela amizade desenvolvida e por ser uma pessoa iluminada no meu caminho.

À Diana Amaral Monteiro e Dra. Juliana Delatin Simonato pela ajuda imprescindível em relação às análises, cálculos e estatística do estresse oxidativo.

À Naiara Souza, meu braço direito o tempo todo. Desde os cuidados dos peixes à realização experimentais e análises. Obrigado de coração!

A todos os amigos do laboratório de zoofisiologia e bioquímica comparativa (LZBC) do DCF: Débora, Bianca, Flavia, Jakeline, Thiaguinho, André, Juliana, Natieli, Rafael (vô), Rafael (Z), André, Aline, Vivian, Natan, Hugo, Cleverson, Iara, Natália, Tayrine, Vinicíus, Thalita e Eliane.

À Helen Sadausakas Henrique pelo ‘puntapé’ inicial na jornada científica.

Aos amigos feitos na Pós durante as disciplinas.

Aos Funcionários do LZBC: ‘Dona’ Vera, Carmem, ‘Dona’ Graça e ‘Seu’ Ângelo e Alexandre pela ajuda durante todo esse tempo.

À Prof^a Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez da Universidade Estadual de Londrina e toda sua equipe, pela ajuda, recepção e amizade.

À Prof^a Dra. Ana Lúcia Kalinin e ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin pela utilização de equipamentos e uso do laboratório.

Ao Departamento de Engenharia de Materiais (UFSCar) pela utilização do microscópio eletrônico de varredura.

Aos grandes amigos, externos à Universidade, que sempre acreditaram, incentivaram e me apoiaram. Que ouviam atentos e interessados a tudo que eu dizia sobre fisiologia, peixes e células (mesmo sem entender nada). Em especial Mari (SOB), Barbosa, Marisol, Kátia, Chico e Andréia.

Às pessoas mais que especiais em minha vida: Juliana Sé, Mariselma Bianchi, José Augusto, Priscila (minha irmã), Anderson Jardim e “Caê” Lima, que a todo tempo estavam soltando ‘um jóia’ com o polegar para me incentivar: Valeu mesmo!!

Ao grande amigo Rafael Poloni, pelo incentivo e ajuda imprescindível em todas minhas análises estatísticas e elaboração da dissertação.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e que passaram pela minha vida deixando algum tipo de ensinamento.

A todos, novamente, meu muito obrigado!

A Vocês:

“Toda amizade é uma história particular. Primeiro, descobre-se o outro. Todo mundo parece igual, mas não é. E é justamente essa coisa diferente em cada um que torna cada pessoa única.

São pedacinhos de nós que vão ficando nas conversas e pedacinhos do coração do outro que vão caminhando pra dentro da gente. Há os risos e os sorrisos, a partilha de coisas simples ou de coisas importantes. As descobertas, muitas vezes, cheias de surpresas. A voz calada que pensa, não diz nada... adivinha!

Fazemos idéia imediata de uma pessoa ao primeiro contato. Julgamos? Talvez. E só os próximos dias, horas ou instantes vão nos dizer se julgamos certo. Acontece de nos enganarmos em certos pontos e quantas vezes não bendizemos isso! Se todos os enganos fossem assim abençoados!! A sensibilidade do outro nos toca. Não sabemos direito o porquê de nos sentirmos próximos de alguém assim tão longe, tão diferente e tão igual.

Mas amizade, como o amor, não se questiona. Vive-se. Dela e pra ela. É preciso dar tempo ao tempo para se saber cativar e ser cativado. Bendita seja essa amizade. Sem prazo, sem tempo, sem hora marcada!

Prova de que Deus se faz conhecer através das pessoas que alcançam nosso coração”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Contaminação do Ambiente Aquático	1
1.2 Atrazina	3
1.3 O Uso de Peixes para Avaliação da Qualidade da Água	8
1.3.1 Brânquias	9
1.3.2 Biomarcadores	12
1.3.2.1 Biomarcadores Bioquímicos	13
1.3.2.2 Biomarcadores Fisiológicos Plasmáticos	19
1.3.2.3 Biomarcadores Morfológicos em Brânquias	19
1.4 A Espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1 Animais	26
3.2 Delineamento Experimental	26
3.3 Coleta de Amostras	27
3.4 Análises Plasmáticas	28
3.4.1 Separação do Plasma	28
3.4.2 Determinação da Osmolaridade Plasmática Total	28
3.4.3 Determinação da Concentração dos Íons Plasmáticos	28
3.5 Análises Bioquímicas	29
3.5.1 Preparação do Homogêinizado	29
3.5.2 Determinação da Proteína Total	29
3.5.3 Determinação das Enzimas Antioxidantes	30
3.5.3.1 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)	30
3.5.3.2 Determinação da Atividade da Catalase (CAT)	30
3.5.3.3 Determinação da Atividade da Glutaciona Peroxidase (GPx)	31
3.5.3.4 Determinação da Atividade da Glutaciona S-Transferase (GST)	31

3.5.3.5 Determinação do Conteúdo da Glutathiona Reduzida (GSH).....	32
3.5.3.6 Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (LPO)	32
3.5.4 Determinação da Atividade da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase Branquial	33
3.6 Procedimentos Histológicos	34
3.6.1 Imunohistoquímica de Células-Cloreto (Contra Na ⁺ /K ⁺ -ATPase).....	34
3.6.2 Determinação da Densidade e Área Fracional de Células-Cloreto	35
3.6.3 Histoquímica de Células Mucosas	36
3.6.4 Análises Histopatológicas	37
3.7 Análises Estatísticas	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 Atividade das Enzimas Antioxidantes e Peroxidação Lipídica	40
4.2 Histopatologia de Brânquias	43
4.3 Células Pavimentosas e Células-Cloreto	48
4.4 Células Mucosas.....	55
4.5 Análises plasmáticas.....	60
5 DISCUSSÃO	61
6 CONCLUSÕES.....	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Equações

Equação 1. Desintoxicação do radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD).

Equação 2. Desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima catalase (CAT).

Equação 3. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, com H_2O_2 como substrato.

Equação 4. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídio (LOOH) como substrato, onde: LOH = álcool não tóxico.

Equação 5. Conjugação da GSH com o substrato eletrofilico tóxico (xenobiótico) pela ação glutationa S-transferase (GST)

Tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da atrazina.

Tabela 2. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.

Tabela 3. Freqüência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 48 horas.

Tabela 4. Freqüência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 14 dias.

Tabela 5. Concentração dos íons e osmolaridade plasmática em *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina.

Figuras

Figura 1. Grupos da triazinas. (A) 1,2,3-triazina. (B) 1,2,4-triazina. (C) 1,3,5-triazina ou s-triazina.

Figura 2. Fórmula estrutural da atrazina.

Figura 3. Estrutura da Atrazina e seus principais metabólitos.

Figura 4. Estrutura branquial de teleósteos. (a). Localização das brânquias; (b) e (c). Ampliação dos arcos branquiais, filamentos e lamelas.

Figura 5. Estrutura das lamelas e principais tipos celulares nas lamelas e filamento de teleósteos. CPi = células pilares; Ci = células indiferenciadas; CPV = células pavimentosas; CC = células-cloreto; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 μm

Figura 6. Esquema representando o sistema antioxidante, enzimático e não enzimático em célula de mamífero.

Figura 7. Modelo representativo da Na^+/K^+ -ATPase e suas subunidades.

Figura 8. Diagrama esquemático do funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase. (1) O ATP e 3 Na^+ se ligam no sítio específico da enzima, (2) a enzima é fosforilada pelo ATP ocorrendo à mudança conformacional (E1) e o sítio para o sódio se torna exposto para a superfície extracelular. As moléculas de sódio, agora com baixa afinidade pela enzima são liberadas e (3) 2 K^+ extracelular se ligam no sítio de ligação com alta afinidade. (4) A enzima é desfosforilada e corre outra mudança conformacional (E2) e (5) os íons potássio são levados para o interior celular.

Figura 9. Diagrama esquemático das lesões branquiais mais comuns. (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; cc = célula-cloreto;

mu = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sangüíneo marginal

Figura 10. Exemplar de *Prochilodus lineatus*, curimbatá.

Figura 11. Atividade da superóxido dismutase (SOD) (A); catalase (CAT) (B); glutaciona peroxidase (GPx), em 48 horas de exposição e da superóxido dismutase (D); catalase (E); glutaciona peroxidase (F), em 14 dias de exposição, nas brânquias de *Prochilodus lineatus* do grupo controle (c) e grupos expostos a 2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle.

Figura 12. Atividade da glutaciona s-transferase (GST) (A) e concentração do dissulfeto de glutaciona (GSH) (B) expostos por 48 horas e a atividade glutaciona s-transferase (C) e concentração do dissulfeto de glutaciona (D) expostos por 14 dias, nas brânquias de *Prochilodus lineatus* do grupo controle (c) e grupos expostos a grupos expostos a 2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina. * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle.

Figura 13. Concentração de hidroperóxido de cumeno (CHP) na peroxidação lipídica (LPO) em brânquias de *P. lineatus* expostos a um grupo controle (c) e expostos 2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 horas (A) ou 14 dias (B). * Indica diferença estatística ($P>0,05$) em relação ao controle.

Figura 14. Histopatologia em brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina. (A) Estrutura branquial normal indicando suas respectivas estruturas; (B) seta vermelha indica hipertrofia do epitélio lamelar e setas pretas, ruptura epitelial; (C) Hiperplasia e fusão de varias lamelas; (D) Constricção do sistema de células pilares; (E) * indica os aneurismas lamelar e (F) Setas indicam dilatação do canal marginal e # indica congestão vascular. Abreviações: CMar = canal marginal; CPV = células pavimentosas; E = eritrócito; CPi = células pilares; CC = células-cloreto; L= lamela e F= filamento. Barra de escala = 20 μm . Coloração = Azul de Toluidina.

Figura 15. (A) Índice de alteração histopatológica (IAH) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 48 horas. (B) Valor médio de alteração.

Figura 16. (A) Índice de alteração histopatológica (IAH) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 14 dias. (B) Valor médio de alteração. * indica diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle.

Figura 17. Eletromicrografias de varredura da superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) grupo controle e (B) grupo exposto a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 horas. (C) Controle e (D) $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ expostos por 14 dias. Setas pretas mostram a diferença entre os padrões das microdobras das células pavimentosas (CPV) entre o grupo exposto e o grupo controle. Escala = $10 \mu\text{m}$.

Figura 18. Eletromicrografias de varredura da superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) grupo controle - 48 horas e (B) grupo exposto a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 horas. (C) grupo exposto a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ expostos por 14 dias e (D) grupo exposto a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ por 14 dias. Setas pretas indicam a superfície apical das células-cloreto. Escalas = $10 \mu\text{m}$.

Figura 19. Imunohistoquímica contra Na^+/K^+ -ATPase das células-cloreto branquiais de *P. lineatus*. (A) Grupo controle 48 horas e (B) Após exposição à concentração de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ em 48 horas. (C) Grupo controle 14 dias (D) $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 14 dias. Barra de escala = $40 \mu\text{m}$.

Figura 20. Valores médios (média \pm erro) de células-cloreto imunomarcadas no filamento e lamela de *P. lineatus* exposto á atrazina. (A) Número de CC/ mm^2 no filamento e lamelas de peixes expostos por 48 horas. (B) Número de CC no filamento e na lamela do grupo exposto durante 14 dias. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Figura 21. Atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase de *P. lineatus* expostos á atrazina durante 48 horas (A) e 14 dias (B). Valores médios (média \pm erro).

Figura 22. Morfometria da superfície das células-cloreto (CC) de *P. lineatus*. (A) Densidade de CC em animais expostos a 48 horas e (B) Densidade de CC em animais expostos por 14 dias. (C) Área fracional de células-cloreto (AFCC) do grupo exposto por 48 horas e (D) AFCC da exposição por 14 dias. * Indica diferença estatística com $P < 0,05$ e ** indica diferença estatística com $P < 0,01$ em relação ao controle.

Figura 23. Histoquímica de células mucosas (CM) nas brânquias de *Prochilodus lineatus*. (A) Corte transversal do filamento branquial mostrando a localização das células mucosas. (B) CM tipo 1 (seta azul); CM tipo 2 (seta verde) e CM tipo 4 (seta vermelha); (C) CM tipo 3 (seta preta). Abreviações: C= cartilagem; F= filamento; L= lamela; Af= artéria aferente; Ef= artéria eferente. Barra de escala = 20 μm .

Figura 24. Células mucosas (CM) tipo 1 no filamento de *P. lineatus* controle e expostos à atrazina. (A) Grupo exposto por 48 horas e (B) Grupo exposto por 14 dias.

Figura 25. Células mucosas tipo 2 e tipo 3 no filamento de *P. lineatus* expostos à atrazina. (A) Grupo exposto por 48 horas e (B) Grupo exposto por 14 dias. * indica diferença estatística com intervalo de confiança de 95% em relação ao controle; ** $p > 0,01$.

Figura 26. Células mucosas tipo 4 no filamento de *P. lineatus* expostos à atrazina. (A) Grupo exposto por 48 horas e (B) Grupo exposto por 14 dias. * indica diferença estatística com intervalo de confiança de 95% em relação ao controle.

Figura 27. Conjugação da atrazina com a GSH, catalisada pela GST como uma via de detoxicação inicial do herbicida (Wiegand et al., 2001).

ABREVIATURAS

CO₂ = Dióxido de Carbono
DEA = Desetilatrazina
HA = Hidroxiatrazina
DIA = Desisipropilatrazina
DACT = Diaminocloroatrazina
DEHA = Desetilhidroxiatrazina
DIHA = Desisopropilhidroxiatrazina
CM = Células mucosas
PVC = Células pavimentosas
CC = Células-cloreto
ERO = espécie reativa de oxigênio
CP = Células pavimentosas
CVS = Seio venoso central
Na⁺ = Íon Sódio
Cl⁻ = Íon Cloreto
Ca²⁺ = Íon Cálcio
NaCl = Cloreto de sódio
NKA = Na⁺/K⁺-ATPase
O₂ = Oxigênio
H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio
O₂^{•-} = Radicais superóxidos
HO₂[•] = Hidroperoxil
LPO = Peroxidação lipídica
SOD = superóxido dismutase
CAT = Catalase
GPx = Glutaciona peroxidase
GST = Glutaciona S-transferase
GSH = Glutaciona reduzida
GSSG = Glutaciona oxidada
GR = Glutaciona redutase
ATP = Adenina trifosfato

ADP = Adenina difosfato

Pi = Fosfato inorgânico

Mg⁺² = Íon Magnésio

GAMPO = *Goat anti mouse peroxidase conjugated*

NGS = *Normal goat serum*

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético

H₂O = Água

NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P

CDNB = 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno

DTNB = Ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico

TCA = Ácido tricloroacético

Fe⁺² = Íon Ferro

FeSO₄ = Sulfato Ferroso

CHP = Hidroperóxido de cumeno

KCl = Cloreto de potássio

GTA = Glutaraldeído

DAB = 3,3'-diaminobenzidina

HMDS = 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano

AFCC = Área fracional das células-cloreto

AB = Azul de Alcian (Alcian Blue)

PAS = Ácido periódico de Schiff

HCl = Ácido clorídrico

VMA = Valor médio de alteração

IAH = Índice de Alteração Histológica

Resumo

O herbicida atrazina é um dos pesticidas mais encontrados em ecossistemas aquáticos em todo o mundo. Nesse estudo os efeitos da atrazina, em concentrações subletais, foram avaliados nas brânquias de *Prochilodus lineatus* quanto aos aspectos morfo-funcionais do órgão. Exemplares juvenis de *P. lineatus* foram divididos em 4 grupos: controle e expostos à atrazina (2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) por 48 horas ou 14 dias. Após os períodos experimentais, amostras de sangue foram obtidas por punção caudal para análise dos íons plasmáticos, as brânquias foram removidas e amostras fixadas para análise morfológica (imunohistoquímica de células-cloreto, microscopia eletrônica de varredura, histoquímica de células mucosas e histopatologia) ou congeladas para análises bioquímicas (atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase e enzimas antioxidantes, GSH e determinação de hidroperóxidos de lipídios). A atividade das enzimas de defesa antioxidante (SOD, CAT e GST) e formação de hidroperóxidos de lipídeos aumentou no grupo exposto a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por 14 dias. Apesar de ocorrer um aumento na Na^+ e Cl^- e na osmolaridade plasmática do grupo exposto por 14 dias não foi caracterizado desequilíbrio eletrolítico visto que a razão Na^+/Cl^- foi similar em todos os grupos. O número total de células-cloreto (CC) diminuiu significativamente apenas no grupo exposto a 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (48 h) e houve um aumento da densidade das CCs na superfície epitelial e da área fracional das CCs em ambos os tratamentos (48 h e 14 dias) nas concentrações de 25 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase não foi alterada em nenhuma condição experimental. Em ambos os períodos houve uma diminuição no número de células mucosas contendo mucinas sulfatadas. Hipertrofia e ruptura do epitélio lamelar e congestão vascular foram as lesões mais comuns encontradas no tecido branquial em animais expostos a atrazina a 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (14 dias) e o Índice de Alterações Histopatológicas foi calculado como leve a moderado. As alterações observadas nas brânquias de *P. lineatus* após a exposição a atrazina sugere que nas concentrações testadas, similares às encontradas em ambientes naturais, pode causar alterações moderadas nas brânquias e comprometer as funções do órgão.

Abstract

The herbicide atrazine is one of the most common pesticides found in the aquatic ecosystems all over the world. In this study the effects of atrazine, at sublethal concentrations, were evaluated on the gills of *Prochilodus lineatus*. Juveniles *P. lineatus* were divided in 4 groups: control and exposed to atrazine (2, 10 e 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 48 hours or 14 days. After the experimental periods, blood samples were taken by caudal puncture for ion plasma analysis and the gills were removed and samples were fixed for morphological analysis (chloride cell immunohistochemistry, scanning electron microscopy, histochemistry of mucous cells and histopathology) or frozen for biochemical analysis (Na^+/K^+ -ATPase and oxidative stress enzyme activity, GSH and determination of lipid hydroperoxidation). The activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT e GST) e lipid peroxidation increased in fish of group exposed to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 14 days. Although there was an increase on plasma Na^+ e Cl^- and osmolality in fish exposed for 14 days it was not characterized as ionic imbalance as the Na^+/Cl^- ratio was similar in all groups. The total number of chloride cells decreased significantly only in the group exposed to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of atrazine (48 h) and the CC density at epithelial surface and the fractional surface area of chloride cells increase in both treatments (48 h and 14 days) in fish exposed to 25 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The Na^+/K^+ -ATPase activity was not altered in any experimental condition. The number of mucous cells containing sulfated mucins decreased. Hypertrophy and disruption of lamellar epithelium and vascular congestion were the most common injuries found in the gill tissue of *P. lineatus* and in fish exposed to 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ atrazine (14 dias) the histopathological changes index was calculate as slightly to moderate. In conclusion, the tested concentrations, which are similar to those found in natural environments, may cause alterations in the gills of *P. lineatus*, so as not to endanger the vital functions of the gills and homeostasis of the animal. The changes observed in the gill of *P. lineatus* after atrazine exposure at tested concentrations, similar to that found in the natural environment, suggested that atrazine may affect the organ function.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contaminação do Ambiente Aquático

Os ambientes aquáticos são denominados ecossistemas aquáticos de água salgada, salobra e de água doce (límnicos). Os límnicos correspondem a 1% de toda água do planeta, sendo 97% desse total se encontram em fontes subterrâneas e sob forma de neve ou geleiras. Os ambientes aquáticos envolvem uma complexa interação entre microorganismos, plantas e animais e como são dinâmicos, sofrem forte influência de alterações climáticas e atividades antrópicas.

O aumento da industrialização tem contribuído para aumentar a poluição ambiental, inclusive à poluição dos ecossistemas aquáticos por inúmeros agroquímicos (Wiegand et al., 2001). O uso massivo de pesticidas na agricultura tem sido uma estratégia para o aumento da produção de alimentos, mesmo considerando que essas substâncias podem alterar o meio ambiente (Chapadense et al., 2009). Existem várias classes de pesticidas como os fungicidas, raticidas, inseticidas, herbicidas, entre outros. Cada grupo apresenta um princípio ativo específico com diferentes mecanismos de ação e, conseqüentemente, com toxicidades variadas (Modesto 2009). Dentre todos os pesticidas, os herbicidas são os mais utilizados na agricultura.

Os herbicidas são compostos orgânicos sintetizados utilizados na agricultura para controlar gramíneas e ervas que são consideradas invasoras (Javaroni et al., 1999). O efeito fitotóxico de um herbicida compreende duas fases: o mecanismo de ação e o modo de ação. Mecanismo de ação é o processo específico do herbicida sobre a célula, causando morte parcial da planta (morte foliar), entretanto, outros processos são necessários para levar uma eliminação efetiva (caule e raízes). A somatória desses processos compreende o modo de ação (Machado, 2005). O controle químico para espécies invasoras é responsável pela contaminação do solo e da água, pois somente 0,1% do que é aplicado atinge seu alvo específico, enquanto o restante tem potencial para se deslocar no ambiente (Ueta et al., 2001),

governado por processos de retenção (sorção e adsorção), de transformação (degradação química e biológica), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento artificial) e de interação com organismos no meio onde estão inseridos (Spadotto, 2006).

A introdução dos herbicidas nos ecossistemas aquáticos ocorre durante e após as aplicações na agricultura, ou diretamente na água, para eliminar espécies de plantas indesejáveis, algas ou vetores de doenças (Rand et al., 1995). Uma vez na água, pode alterar as comunidades aquáticas, dependendo das características da água, da comunidade biológica e do próprio poluente. Em alguns casos, os agentes tóxicos podem matar os animais e em outros, podem promover alterações subletais ou se acumular em tecidos exercendo seus efeitos após uma exposição mais prolongada a concentrações muito baixas, que dificilmente são detectadas quimicamente (Abel, 1989).

Os herbicidas são os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, chegando a aproximadamente 55% de todos os pesticidas utilizados (Correia e Langenbach, 2006). Desde as últimas décadas seu uso tem crescido de forma acentuada em solos agricultáveis brasileiros e uma das classes de herbicidas mais utilizadas são as triazinas. As propriedades das triazinas foram descobertas, em 1952, com estudos realizados para testar esse herbicida no crescimento seletivo de plantas. A formulação foi determinada a partir de suas propriedades físico-químicas e do modo de aplicação (Javaroni et al., 1999).

As triazinas (simazina, propazina, ametrina, cianazina e atrazina) são os herbicidas mais antigos e mais comumente usados, representando cerca de 30% dos herbicidas mundialmente comercializados (Tomita e Beyruth, 2002; Ventura et al., 2008). No Brasil, esses produtos são empregados no controle pós e pré emergentes de plantas invasoras, devido à capacidade de inibir a fotossíntese, principalmente em culturas de milho e cana-de-açúcar (Vidal e Merotto Jr., 2001). Quimicamente, as triazinas são derivados nitrogenados heterocíclicos com estrutura do anel aromático contendo átomos de carbono e nitrogênio (Figura 1). A maioria das triazinas é simétrica (s-triazinas), ou seja, os átomos de carbonos e nitrogênios são alternados entre si (Archangelo, 2003) e dentre elas, a atrazina é o princípio ativo mais utilizado no mundo.

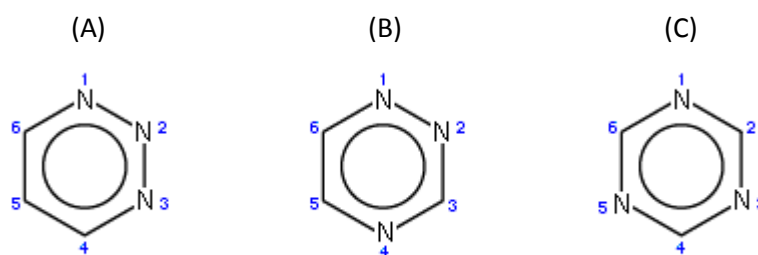


Figura 1. Grupos da triazinas. (A) 1,2,3-triazina. (B) 1,2,4-triazina. (C) 1,3,5-triazina ou s-triazina.

1.2 Atrazina

A atrazina, cujo nome químico é 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (Figura 2), é o herbicida mais utilizado dentre os triazínicos. Assim como as demais moléculas, é formada por um anel heterocíclico clorado e *N*-alquilado, que confere à molécula uma grande resistência á degradação biológica (Howard, 1991; Solomon et al., 2008). A atrazina foi comercializada pela primeira vez na década de 1950 e devido o seu uso intensivo durante todos esses anos, é o herbicida mais detectado em monitoramento de ecossistemas aquáticos (Spadotto et al., 2004).

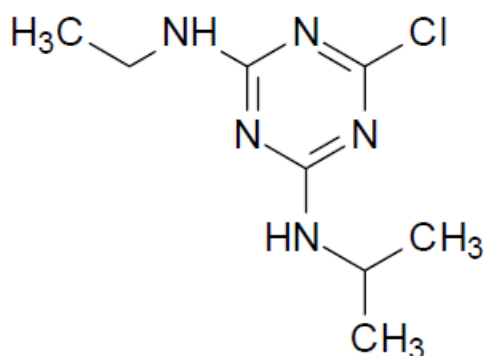


Figura 2. Fórmula estrutural da atrazina.

Por ter sido desenvolvida como um fitotóxico, como de um mecanismo de ação seletivo para inibir a fotossíntese, a toxicidade da atrazina é maior em plantas que animais. É absorvida mais facilmente pelas raízes e levada, via xilema, para a parte aérea das plantas alvo (Rodrigues e Almeida, 2005). A atrazina inibe a fotossíntese via competição pelo sítio de ligação da plastoquinona II no processo da transferência de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I (Devine et al., 1993). Essa inibição cessa a síntese de carboidratos, conseqüentemente levando a uma redução no carbono e acúmulo de CO₂ na planta, levando-a a clorose foliar (Giddings, 2005; Solomon et al., 2008). A atrazina é utilizada para controle de plantas invasoras, principalmente na cultura de algodão, milho, sorgo, feijão, abacaxi, soja e cana-de-açúcar, além do uso no preparo de áreas para o plantio (Santana et al., 2003).

A molécula de atrazina é altamente persistente no ambiente por possuir hidrólise lenta, alta sorção pela matéria orgânica e argila, baixa pressão de vapor, alto potencial de escoamento e propriedade hidrofílica, apresentando moderada solubilidade em água (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas da atrazina.

Variável	Dados
Nome Comum	Atrazina
Nome Químico	2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina
N° CAS	1912-24-9
Fórmula Bruta	C ₈ H ₁₄ ClN ₅
Ponto de Fusão	173 – 175 °C
Estado físico	Branco, cristalino, não corrosivo, não explosivo
Peso Molecular	215,7
Pressão de Vapor	2,9.10 ⁻⁷ mmHg (a 20 °C)
Constante de dissociação (PKa)	1,7 (a 21 °C)
Coeficiente de partição octanol : água (Kow)	481
Coeficiente de partição de carbono orgânico (Koc)	100

Baseado em Eisler (1989) e Vidal e Merotto Jr. (2001).

As concentrações de atrazina no ambiente são extremamente variadas. Ela pode ser encontrada até um ano após a aplicação e por essa razão dessas características, torna-se um contaminante potencial de solos, águas superficiais e águas subterrâneas (Ueta, 2001; Brodeur et al., 2009). A atrazina persiste sob condições de clima frio e seco, em ambientes de pH estável e solos com textura fina (Graymore, 2001). A meia vida da atrazina na água é de 41 a 237 dias. No solo ou sedimento, varia entre 58 a 547 dias e por dissipação no campo é de 8 a 99 dias (Novartis, 2000; Giddings, 2005; Solomon et al., 2008). Quantidades significativas da mesma podem ser acumuladas no solo após a aplicação, dependendo do tipo de solo, percentual de matéria orgânica, quantidade de argila, pH e estrutura do solo. A movimentação da atrazina ocorre principalmente na fase aquosa, portanto, o transporte de atrazina adsorvido por solo erodido é possível, porém não muito comum (Kookana, 1998). Uma grande quantidade é perdida para águas superficiais e subterrâneas através da lixiviação. Conseqüentemente, a contaminação desses corpos d'água é inevitável. Desse modo, a presença de atrazina na água aumenta o potencial de exposição dos organismos aquáticos, particularmente os de sistemas estáticos.

A contaminação por atrazina ocorre principalmente nas águas superficiais e lóticas (rios e córregos), entretanto, em sistemas aquáticos lênticos (lagos, lagoas, zonas úmidas), a concentração de atrazina é freqüentemente 2-10 vezes maiores do que nos lóticos (Kolpin, 1997; Rohr e McCoy, 2010). A atrazina na água varia de concentrações altas, como acima de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ em águas adjacentes a campos tratados, até concentrações baixas como $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Readman et al., 1993; Schottler et al., 1994; Graymore et al., 2001). Normalmente, as concentrações de atrazina encontradas em águas são de aproximadamente $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Nwani et al., 2010), porém, encontram-se, em raras ocasiões, concentrações acima desse valor, independente da área de aplicação (Battaglin et al., 2000; Giddings et al., 2005; Solomon et al., 2008). A atrazina também pode ser encontrada em águas de precipitações locais e em grandes distâncias, por exemplo, acima do círculo ártico, embora em baixíssimas concentrações. Hall (1993) relatou a presença de 445 ng.L^{-1} de atrazina em chuvas coletadas por 18 meses em locais diferentes em Ontário (Canadá). A presença de atrazina em precipitações resulta da volatilização durante o processo de aplicação (Solomon et al., 2008). Em ecossistemas estuarinos e de

águas costeiras, a presença de atrazina é relativamente baixa devido à diluição e degradação (Graymore et al., 2001).

O crescente número de relatos de contaminações de ecossistemas aquáticos pela atrazina levou à redução da concentração máxima permitida na França de 3 kg.ha⁻¹ para 1,5 kg.ha⁻¹ e a sua proibição dela na Alemanha, Itália e Suécia. Nos Estados Unidos, sua utilização é controlada e é permitida uma concentração de 3 µg.L⁻¹ na água e proibida em algumas áreas (Spadotto, 2004). No Brasil, a concentração máxima permitida em águas doces de classe I a classe III é de 2 µg.L⁻¹ pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, segundo a resolução CONAMA 357/2005 (CONAMA, 2005). As concentrações recomendadas para aplicação variam de 2,5 a 4,5 kg.ha⁻¹, e seguindo essa recomendação, uma aplicação é suficiente para atender às necessidades da cultura (Compêndio de defensivos agrícolas, 1999).

Uma vez no ambiente, a atrazina além de ser transportada e/ou retida, passa por um processo de degradação. Os metabólitos formados têm características próprias quanto à persistência e toxicidade. Há 5 principais processos de degradação da atrazina no ambiente: hidrólise, adsorção, volatilização, fotólise e degradação biológica (Graymore et al., 2001). A salinidade do solo também pode influenciar na degradação, já que solos mais salinos possuem uma diminuição da comunidade microbológica (Lin et al., 2008). Na água, a atrazina é muito resistente à degradação microbológica. Desse modo, a principal via de degradação é a hidrólise, uma vez que a fotólise não ocorre em comprimentos de onda superiores a 300 nm (Howard, 1991; Winkelmann e Klaine, 1991; Solomon et al., 2008). Os principais produtos da atrazina são: Desetilatrazina (DEA); Hidroxiatrazina (HA); desisopropilatrazina (DIA), diaminocloroatrazina (DACT), desetilhidroxiatrazina (DEHA) e desisopropilhidroxiatrazina (DIHA), apresentados na figura 3.

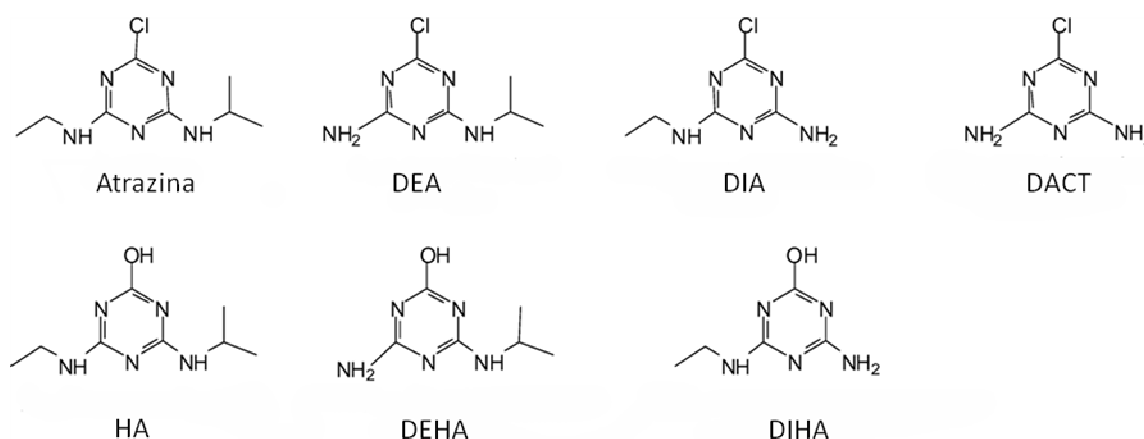


Figura 3. Estrutura da Atrazina e seus principais metabólitos (Solomon et al., 2008).

Segundo a agência de vigilância sanitária, ANVISA, a atrazina se enquadra na classe toxicológica III, a qual a denomina como moderadamente tóxica aos organismos aquáticos (ANVISA). Animais aquáticos são expostos quando o herbicida atinge os corpos d'água. Dessa forma, a atrazina demonstra-se bastante tóxica para algas, afetando diretamente as comunidades desses organismos (Graymore et al., 2001). A toxicidade em invertebrados aquáticos é bastante relatada e entre os diversos efeitos estão, por exemplo, danos histológicos em rins de moluscos (Zupan e Kalafatic, 2003), aumento no número de hemócitos de gastrópodes (Russo e Lagadic, 2004) e distúrbios osmorregulatórios em crustáceos (Silvestre et al., 2002).

Em vertebrados aquáticos, efeitos letais e subletais de atrazina são estudados desde a década de 70 (Peters e Cook, 1973; Macek et al., 1976; Eisler, 1989) e até hoje, procura-se entender a ação desse herbicida sobre esses organismos, principalmente em peixes. De uma forma geral, vários estudos relatam que impactos significativos podem ocorrer em baixas concentrações e em longos tempos de exposição (Graymore et al., 2001).

Para peixes, a concentração letal varia de 3 a 100 mg.L⁻¹, como por exemplo, CL50-96h é 4,3 mg.L⁻¹ para *Poecilia reticulata* e 100 mg.L⁻¹ para *Carassius carassius* (Giddings et al., 2005; Solomon et al., 2008), enquanto efeitos subletais podem ocorrer em concentrações menores que 2 mg.L⁻¹ e após longo tempo de exposição,

pode levar a alterações em vários tecidos desses animais (Neskovic' et al., 1993). O estado fisiológico e o comportamento dos peixes podem ser afetados pela atrazina mesmo em concentrações tão baixas como, por exemplo, $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Chapman e Stranger, 1992; Davies et al., 1994; Graymore et al., 2001). Esses efeitos tóxicos resultam em alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em diversos tecidos dos peixes (Heath, 1995), como por exemplo, formação de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* (Moron et al., 2006) e mudanças comportamentais em *Brachydanio rerio* expostos a concentrações de $6 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (Steinberg et al., 1995). Entretanto, há pouca bioacumulação em peixes, pelo fato da atrazina ser rapidamente metabolizada (Solomom et. al., 2008). Dessa forma, a atrazina não bioacumula ou biomagnifica na cadeia alimentar e as respostas toxicológicas e fisiológicas dependem da concentração da atrazina na água e do tempo de exposição.

1.3 O Uso de Peixes para Avaliação da Qualidade da Água

A preservação da qualidade de água nos ecossistemas aquáticos é de fundamental importância tanto para utilização de recursos domésticos e agrícolas quanto para a preservação da biota. Os programas de monitoramento ambiental aquático têm usado vertebrados aquáticos, no caso os peixes, como bioindicadores para avaliação da qualidade de água. O interesse no uso de bioindicadores no monitoramento aumentou acentuadamente na última década pelo fato de estarem, em geral, no topo da cadeia trófica nesses ambientes (Adams, 2002). Esses organismos são sensíveis às alterações no ambiente e as respostas biológicas podem ser iniciadas em concentrações de substâncias químicas abaixo do limite de detecção dos métodos analíticos disponíveis ou após a exposição química ter ocorrido. O uso dos peixes não se restringe apenas na avaliação do número e abundâncias de espécies no ambiente, mas uma análise detalhada das condições de saúde da espécie via biomarcadores. Nesse contexto, as brânquias dos peixes, que exercem funções vitais para a sobrevivência e/ou adaptação dos peixes aos

mais variados ambientes, têm sido consideradas como potenciais órgãos cuja integridade poderia ser utilizada como indicadores da qualidade da água (Machado, 1999).

1.3.1 Brânquias

As brânquias dos peixes possuem uma grande área de superfície de contato com o meio externo e tem um papel importante em inúmeras funções vitais para os peixes, incluindo respiração, alimentação, osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de produtos nitrogenados (Alazemi et al., 1996; Graymore et al., 2001; Fernandes e Mazon, 2003). As brânquias são responsáveis pela transferência dos gases respiratórios e a efetividade da sua função depende de um estado íntegro das lamelas, considerando a espessura da barreira de difusão água-sangue, a magnitude da ventilação e o fluxo sanguíneo (Sakuragui et al., 2003).

Nos teleósteos, as brânquias são formadas por oito arcos branquiais dispostos quatro a quatro lateralmente na cavidade orofaríngea protegida e separada do meio externo pelo opérculo (Figura 4 A). Em cada arco branquial, formado pelos ossos epi- e ceratobranquial, existem expansões denominadas rastros branquiais cuja disposição e formato anatômico está relacionado aos hábitos alimentares da espécie (Eiras-Stofella et al., 2001). Do lado oposto estão localizados os filamentos branquiais ou lamelas primárias (Figura 4 B), unidos até certa extensão por um septo interbranquial. Em cada filamento, localizado acima e abaixo do seu eixo longitudinal, há lamelas transversais, ou lamelas secundárias, que são os locais onde as trocas gasosas ocorrem. A circulação branquial consiste em um circuito artério-arterial e um artério-venoso. O primeiro está relacionado à troca de gases nas lamelas e é constituída pela artéria aferente branquial, artéria aferente primária, arteríola aferente lamelar ou secundária, e após o sangue passar pelas lamelas é constituído por arteríola eferente lamelar ou secundária, artéria eferente primária e artéria eferente branquial. O segundo é responsável pela distribuição de parte do sangue oxigenado aos tecidos branquiais e dá origem à veia branquial. O fluxo

sanguíneo através das lamelas é contracorrente com o fluxo da água entre elas (Evans et al., 2005) (Figura 4 C).

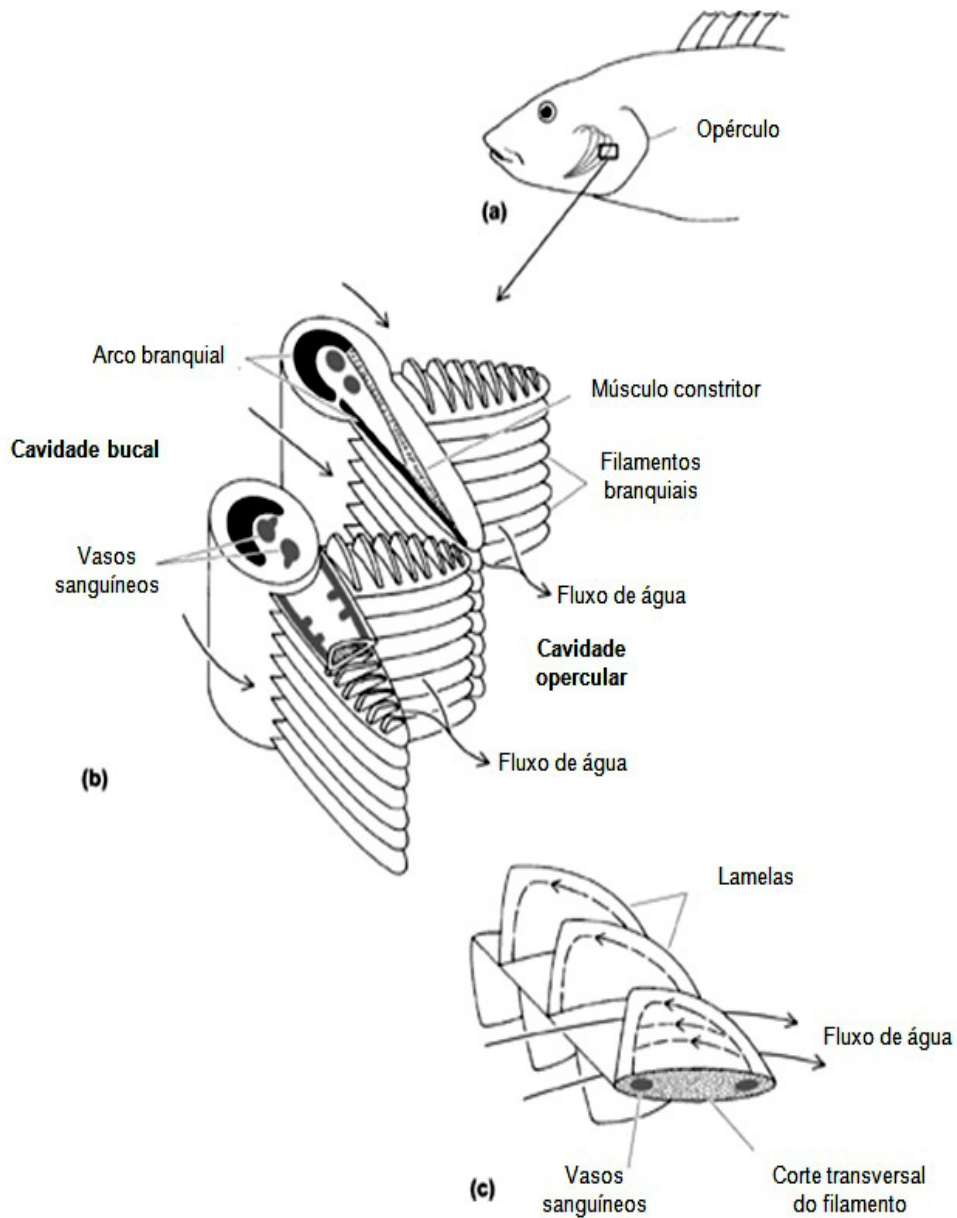


Figura 4. Estrutura branquial de teleósteos. (a). Localização das brânquias; (b) e (c). Ampliação dos arcos branquiais, filamentos e lamelas (Adaptado e traduzido de Hirose et al., 2003)

Os tipos celulares que constituem o epitélio do filamento da região basal até a superfície do epitélio são as células não-diferenciadas, neuroepiteliais, células-cloreto, células mucosas e células pavimentosas (Figura 5).

As lamelas são constituídas de duas camadas de células, a camada externa, em contato com a água, que consiste de células pavimentosas e a camada interna que consiste em células indiferenciadas (Ci) (Moron et al., 2009) que recobrem as células pilares (CPi) que são responsáveis pela sustentação e formação de espaços por onde o sangue atravessa a lamela.

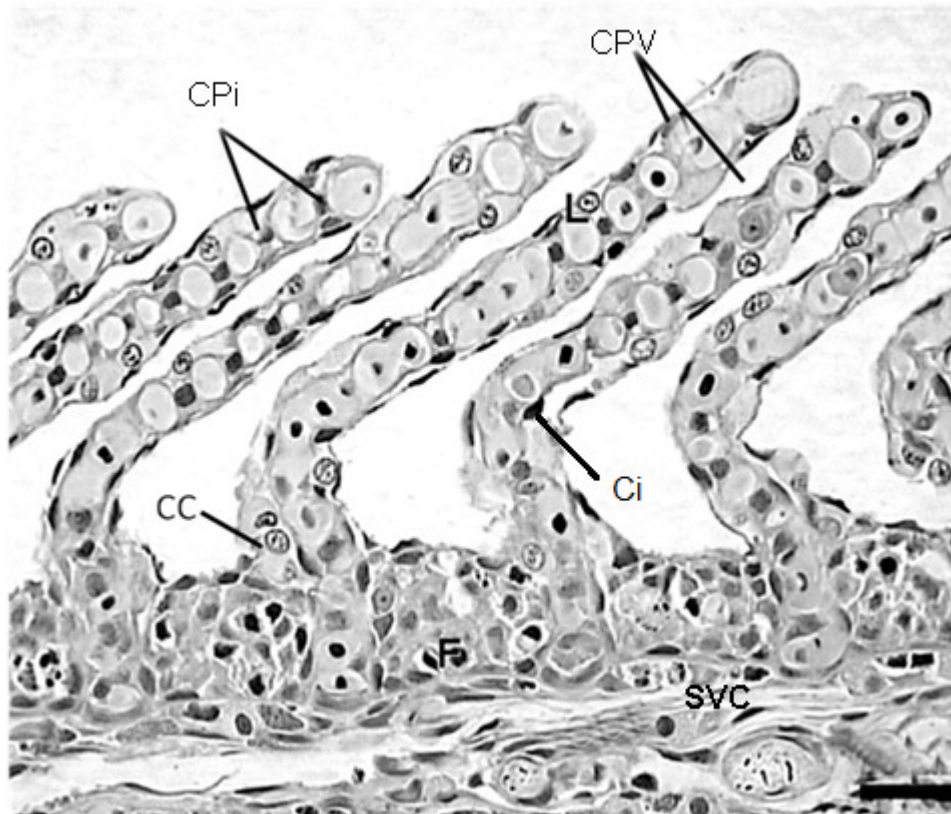


Figura 5. Estrutura das lamelas e principais tipos celulares nas lamelas e filamento de teleostes. CPi = células pilares; Ci = células indiferenciadas; CPV = células pavimentosas; CC = células-cloreto; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 μ m (Foto: Marcelo G. Paulino).

As células pavimentosas (CPVs) recobrem 90% da área de superfície do filamento e lamela. As células mucosas (CM) estão localizadas principalmente nas bordas do filamento entre as células epiteliais e o muco produzido por elas, o qual tem sido considerado como uma importante proteção contra partículas abrasivas

presentes na água, bactérias, parasitas e poluentes, além de auxiliar a regulação iônica (McCahon et al., 1987; Handy et al., 1989; Singh e Munshi, 1996; Deszfuli et al., 2003; Ledy et al., 2003; Powel, 2007; Singh e Banerjee, 2008; Moron et al., 2009).

As células-cloreto (CC), ou células ricas em mitocôndrias (CRMs), estão presentes principalmente no epitélio do filamento e são consideradas os locais primários de absorção ativa dos íons sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) em peixes de água doce e de secreção ativa do cloreto de sódio (NaCl) nos teleósteos marinhos. Em algumas condições ambientais, elas podem estar presentes nas lamelas de algumas espécies (Evans et al., 2005). AS CCs são caracterizadas pela presença de túbulos, ricos em unidades de Na^+/K^+ -ATPase, formados por extensões da membrana basolateral no interior da célula, que aumentam a sua superfície basolateral em contato com o meio intersticial.

1.3.2 Biomarcadores

Um biomarcador pode ser uma alteração bioquímica, fisiológica ou morfológica como consequência do contato de um organismo a um xenobiótico ou de seu efeito (Melancon, 1995). Esses biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde dos ecossistemas aquáticos e têm sido usados em programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos. Sensíveis ao agente estressor ajudam rapidamente a identificar os mecanismos básicos da relação causal entre o estressor e seus efeitos (Bainy, 1993; Adams, 2002).

Ao entrar no organismo, no caso dos peixes principalmente pelas brânquias, o xenobiótico é transportado via corrente sanguínea até os demais órgãos, onde são armazenados e metabolizados para posterior eliminação. Como a maioria dos pesticidas é lipofílica atravessam as membranas causando danos aos componentes celulares. O estudo da ecotoxicologia, seja um bioensaio ou biomonitoramento, deve utilizar um conjunto de biomarcadores, tendo então uma visão mais ampla dos efeitos tóxicos de contaminantes no organismo estudado (Hinton et al., 1992).

1.3.2.1 Biomarcadores Bioquímicos

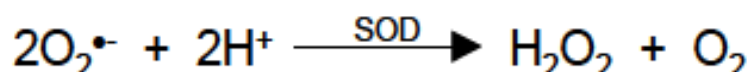
O uso de biomarcadores bioquímicos confere algumas vantagens, pois são normalmente os primeiros a serem detectados. São muito sensíveis, apresentam alta especificidade, são de baixo custo e fornecem informações do efeito metabólico causado pelo xenobiótico (Amorim, 2003).

A contaminação aquática é um dos principais responsáveis pelo estresse oxidante, devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) nos organismos expostos (Ahmad et al., 2000). O termo ERO também é utilizado para espécies que não são radicais livres, mas são capazes de gerar radicais livres, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell e Gutteridge, 2000).

O oxigênio (O_2) é uma molécula que pode ser parcialmente reduzida, formando vários agentes quimicamente reativos. Quando reduzido de forma incompleta, pode formar intermediários reativos como os radicais superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As ERO podem reagir com todas as biomoléculas celulares, alterando total ou parcialmente a sua função e afetando o metabolismo. Uma das principais lesões causadas pelas ERO é a peroxidação lipídica (LPO) ou lipoperoxidação, ou seja, a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular (Hogg e Kalyanaraman, 1998). A LPO resulta em transtornos na permeabilidade, alteração do fluxo iônico, alteração da seletividade de nutrientes e posteriormente, levando ao rompimento da membrana ou mesmo quebras em moléculas menores, como determinados aldeídos, que por si só já são tóxicos para a célula (Halliwell e Gutteridge, 2000).

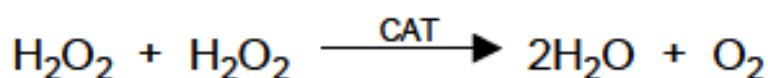
Os radicais livres são formados em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos de defesas antioxidantes celulares, que são os responsáveis pela inibição e/ou redução das lesões causadas pelas ERO. Essas defesas antioxidantes podem ser classificadas como enzimáticas e não enzimáticas, de acordo com sua estrutura biológica. Entre as enzimáticas destacam-se as defesas primárias como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e enzima de biotransformação glutathione S-transferase (GST), enquanto que, entre os sistemas não enzimáticos destacam-se o dissulfeto de glutathione (GSH), e vitaminas A, C e E (Schlenk et al., 1999).

Nos eucariontes, a SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos na sua composição: Cu-Zn SOD e SOD-Mn. Essa enzima tem função importante, pois catalisa a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e água (Equação 1). Dentre os diferentes tipos de SOD, que depende do metal que atua como co-fator em seu sítio catalítico, todas agem da mesma forma como apresentada na equação 1 (Monteiro, 2010).



Equação 1. Desintoxicação do radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) pela enzima superóxido dismutase (SOD)

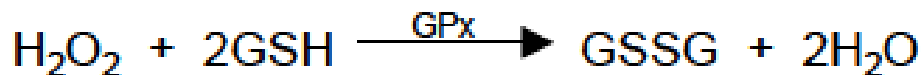
A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 em água e O_2 (Equação 2) e por isso considerada um dos maiores componentes de defesa antioxidante primária (Gaetani et al., 1989). A CAT decompõe o peróxido de hidrogênio a uma taxa extremamente rápida de cerca de $10^7 \text{ mol.L}^{-1}.\text{seg}^{-1}$ (Scandalios, 2005). Por possuir um K_m elevado, a CAT é dificilmente saturada pela concentração de H_2O_2 . Segundo Scandalios (2005), a redução do peróxido de hidrogênio pela CAT requer altas concentrações de H_2O_2 , atuando como um suporte para o sistema glutathiona dependente. Sendo assim, em baixas concentrações, os peróxidos seriam eliminados pela GPx e em altas concentrações pela CAT.



Equação 2. Desintoxicação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima catalase (CAT).

A GPx é uma enzima que catalisa a redução do H_2O_2 e de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH, onde L é um lipídeo), convertendo-os em água e seus correspondentes alcoóis não tóxicos (Equação 3 e 4, respectivamente) (Nordberg e Arner, 2001) por oxidação da glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada

(GSSG). A GPx é extremamente específica para a GSH e tem capacidade de desintoxicar rapidamente o H₂O₂ e certos lipoperóxidos (Liebler e Reed, 1997). Em relação à afinidade pelo peróxido de hidrogênio, a GPx tem maior afinidade pelo substrato do que a CAT que tem menor afinidade porém age mais rapidamente (Eaton, 1991).

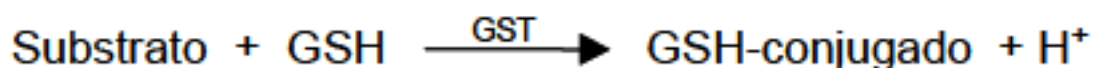


Equação 3. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, com H₂O₂ como substrato.



Equação 4. Oxidação da GSH a GSSG, pela ação da GPx, utilizando hidroperóxido de lipídio (LOOH) como substrato, onde: LOH = álcool não tóxico.

A GST é uma família de isoenzimas cuja atividade pode reduzir ou evitar que ocorra o estresse oxidativo devido a metabolização de uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, por meio da conjugação desta com a GSH que formam conjugados solúveis em água facilitando a excreção desses substratos (Equação 5) (Van der Oost et al., 2003). A ação integrada de todas as enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) é importante para a manutenção do equilíbrio e integridade celular (Schneider e Oliveira, 2004).



Equação 5. Conjugação da GSH com o substrato eletrofílico tóxico (xenobiótico) pela ação glutatona S-transferase (GST)

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, a GSH é um elemento fundamental para o sistema de defesa. A GSH é um tripeptídeo que contém um grupo sulfidril (-SH) presente na cisteína, que confere a capacidade redutora à molécula (Meister e Anderson, 1983). Pode variar de sua forma reduzida (GSH) para a forma oxidada

(GSSG) e ser reciclada pela glutiona redutase (GR) para a forma reduzida novamente. A GPx e a GST dependem da GSH, portanto a GSH é importante na proteção celular contra agentes oxidantes e na defesa contra xenobióticos (Jordão Junior et al., 1998). A ação integrada desses agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão representadas na figura 6.

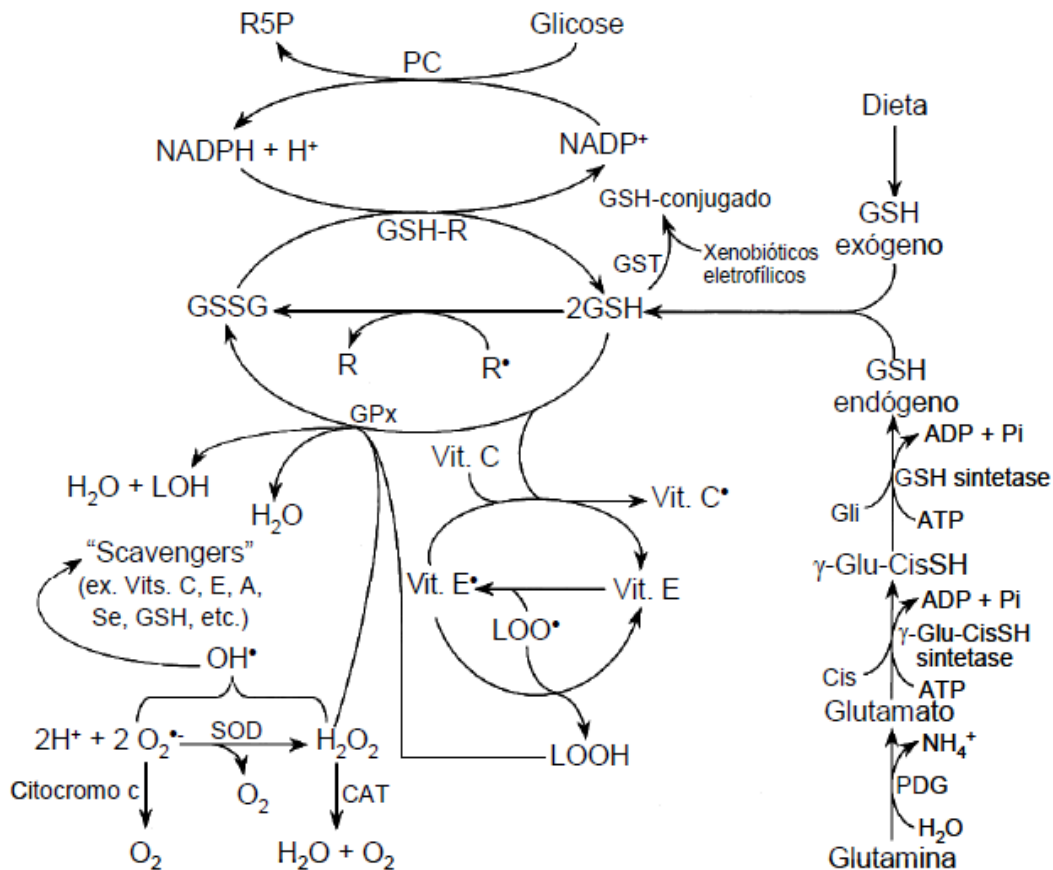


Figura 6. Esquema representando o sistema antioxidante, enzimático e não enzimático em célula de mamífero (Fang et al., 2002).

O estresse oxidativo, inclusive nas brânquias, é, em geral, um efeito tóxico comum causado por pesticidas e os peixes respondem alterando a atividade das enzimas antioxidantes para neutralizar os efeitos dos radicais livres gerados durante a metabolização destes herbicidas no organismo (Viarengo et al 1997).

A atividade das adenosinas trifosfatases (ATPases) também é um biomarcador sensível de toxicidade (Yadward et al., 1990; Agrahari e Gopal, 2008). Elas hidrolisam adenina trisfosfato (ATP) em adenina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico

(Pi) (Kultz e Somero, 1995). Elas são enzimas de membrana e possuem variadas formas, que são responsáveis pelo transporte de íons, volume celular, pressão osmótica e permeabilidade da membrana (Kundu et al., 1992; Agrahahi e Gopal, 2008). Dessas enzimas, a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (Figura 7) tem importância na regulação da osmolaridade do corpo todo (Alam e Frankel, 2006), promovida pelo transporte ativo de íons sódio e íons potássio através da membrana (Bianchini et al, 1999).

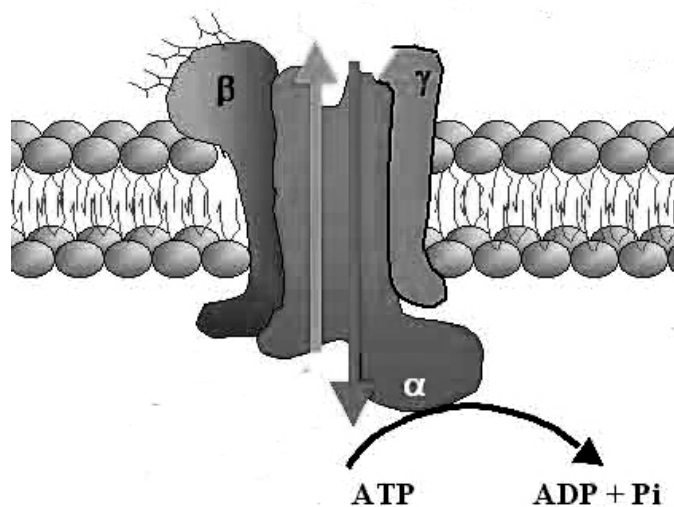


Figura 7. Modelo representativo da Na^+/K^+ -ATPase e suas subunidades (adaptado de Watson e Barcroft, 2001).

A NKA é formada por três subunidades (α , β e γ), onde a α é catalítica, possui massa molecular de 100 kDa e possui sítios de ligação para o Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , ATP e oubaína. A subunidade β , menor e com massa molecular de 55 kDa, não possui sítio de ligação, assim como a γ , mas é importante pela inserção na membrana e localização da enzima (Blanco e Mercer, 1998; Therien e Blostein, 2000; Lin et al., 2004; Morrison et al., 2006). No transporte de íons, a enzima consiste em duas diferentes conformações, E1 (fosforilada) e E2 (desfosforilada). Na primeira, ela tem alta afinidade pelo Na^+ intracelular e na E2 tem alta afinidade pelo K^+ extracelular. A ciclagem entre E1 e E2 resulta no transporte de 3 íons sódio para fora da célula e a entrada de 2 íons potássio (Figura 8), utilizando uma molécula de ATP e um íon Mg^{+2} como co-fator na fosforilação da enzima (Horisberger, 2004; Massui, 2005).

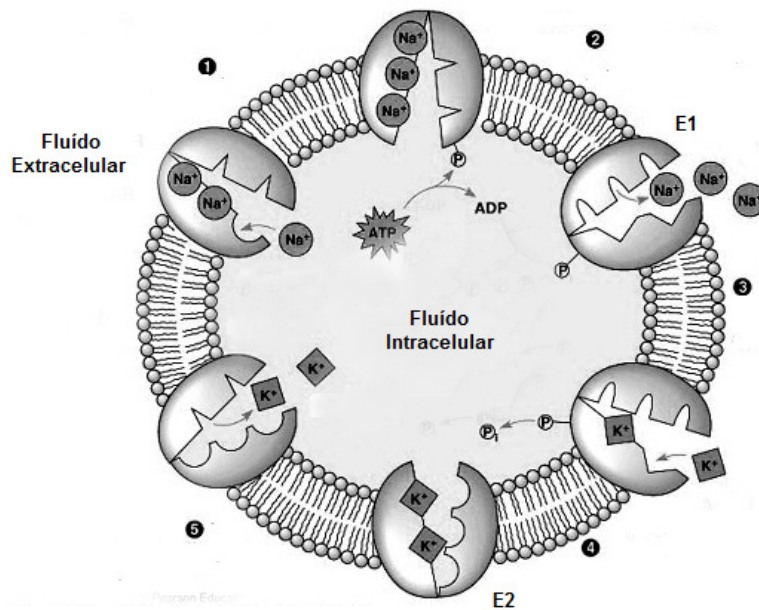


Figura 8. Diagrama esquemático do funcionamento da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$. (1) O ATP e 3 Na^+ se ligam no sítio específico da enzima, (2) a enzima é fosforilada pelo ATP ocorrendo à mudança conformacional (E1) e o sítio para o sódio se torna exposto para a superfície extracelular. As moléculas de sódio, agora com baixa afinidade pela enzima são liberadas e (3) 2 K^+ extracelular se ligam no sítio de ligação com alta afinidade. (4) A enzima é desfosforilada e corre outra mudança conformacional (E2) e (5) os íons potássio são levados para o interior celular. (Adaptado de Cummings, B. – Pearson Education, Inc)

O gradiente iônico entre o meio externo e o fluido extracelular de peixes é mantido por células branquiais especializadas, as células-cloreto. Essas células são caracterizadas pelos altos níveis de NKA (Perry, 1997; Karnaky, 1998; Choe et al., 1999). Muitos pesquisadores já mostraram que a abundância e atividade da NKA nas brânquias são alteradas quando a concentração de íons muda no ambiente aquático (Kamiya e Utida, 1968; Thomson e Sargent, 1977; Epstein, 1980; Shikano e Fujio, 1998). Os xenobióticos podem alterar a atividade da enzima por interrupção da produção de energia em vias metabólicas ou interagindo diretamente sobre a enzima (Sancho et al., 1997; Agrahari e Gopal, 2008). Assim, a enzima NKA pode efetivamente ser utilizada como um indicador da competência osmorregulatória (Shikano e Fujio, 1998).

1.3.2.2 Biomarcadores Fisiológicos Plasmáticos

Atualmente, biomarcadores fisiológicos plasmáticos são utilizados extensivamente para documentar e quantificar tanto a exposição quanto os efeitos causados por esses poluentes (Winkaler et al., 2001). O sangue é o primeiro tecido a entrar em contato com os xenobióticos e ao serem distribuídos entre os demais tecidos, estes também sofrerão distúrbios fisiológicos devido à exposição (Cerqueira e Fernandes, 2002; Mazon et al., 2002; Ruas et al., 2008; Sadauskas-Henrique et al., 2010). O sangue é constituído basicamente de células e plasma, onde estão dissolvidos os gases, hormônios e íons responsáveis pela homeostasia do organismo. Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica é uma consequência do estresse em peixes. Isso ocorre entre a íntima relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente externo (Wendelaar Bonga, 1997). A alteração na concentração plasmática de íons sódio, potássio e cloreto e a osmolaridade são exemplos de efeitos subletais de poluentes em peixes (Abel, 1989). Assim, eventuais variações nos parâmetros hematológicos, incluindo as concentrações de íons e osmolaridade, podem indicar alterações causadas pela agente estressor (Camargo e Martinez, 2006).

1.3.2.3 Biomarcadores Morfológicos em Brânquias

Alterações morfológicas nas brânquias podem representar estratégias adaptativas para a conservação de algumas funções biológicas quando o animal está frente a mudanças na qualidade da água (Laurent e Perry, 1991). Entretanto, qualquer alteração na estrutura das brânquias afeta, diretamente ou indiretamente, as trocas gasosas e o balanço hidromineral (Wendelaar Bonga, 1997).

Os estudos histopatológicos merecem destaque, uma vez que ajudam a identificar órgãos alvo da toxicidade e os mecanismos de ação dos contaminantes. Alterações histopatológicas têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores na

avaliação da saúde de peixes frente à exposição a contaminantes, tanto em estudos de laboratórios (Wester e Canton, 1991; Thophon et al., 2003) como em estudos de campo (Hinton et al., 1992; Schwaiger et al., 1997). Os efeitos em níveis histopatológicos são visíveis como em outras medidas de toxicidade, tais como mortalidade e mudanças comportamentais (Wester, 2002).

Em uma revisão que reuniu 130 publicações, Mallatt (1985) realizou um levantamento sobre os tipos de alterações branquiais frente a agentes químicos e físicos presentes no ambiente. Enfocando principalmente as regiões interlamelar e lamelar, as alterações morfológicas mais encontradas foram: descolamento do epitélio, necrose, fusão lamelar, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia lamelar por crescimento celular, ruptura de células epiteliais, hipersecreção de muco, aneurisma lamelar, congestão (alteração no espaço sanguíneo delimitado pelas células pilares), proliferação de células mucosas e de células-cloreto e infiltração de leucócitos no epitélio (edema), todas ilustradas na Figura 9 (Machado, 1999). Lesões nos tecidos aparecem a médio prazo em resposta a exposições subletais e a relevância da lesão depende da importância da patologia, isto é, como afeta a função do órgão e a habilidade do peixe para sobreviver (Bernet et al., 1999).

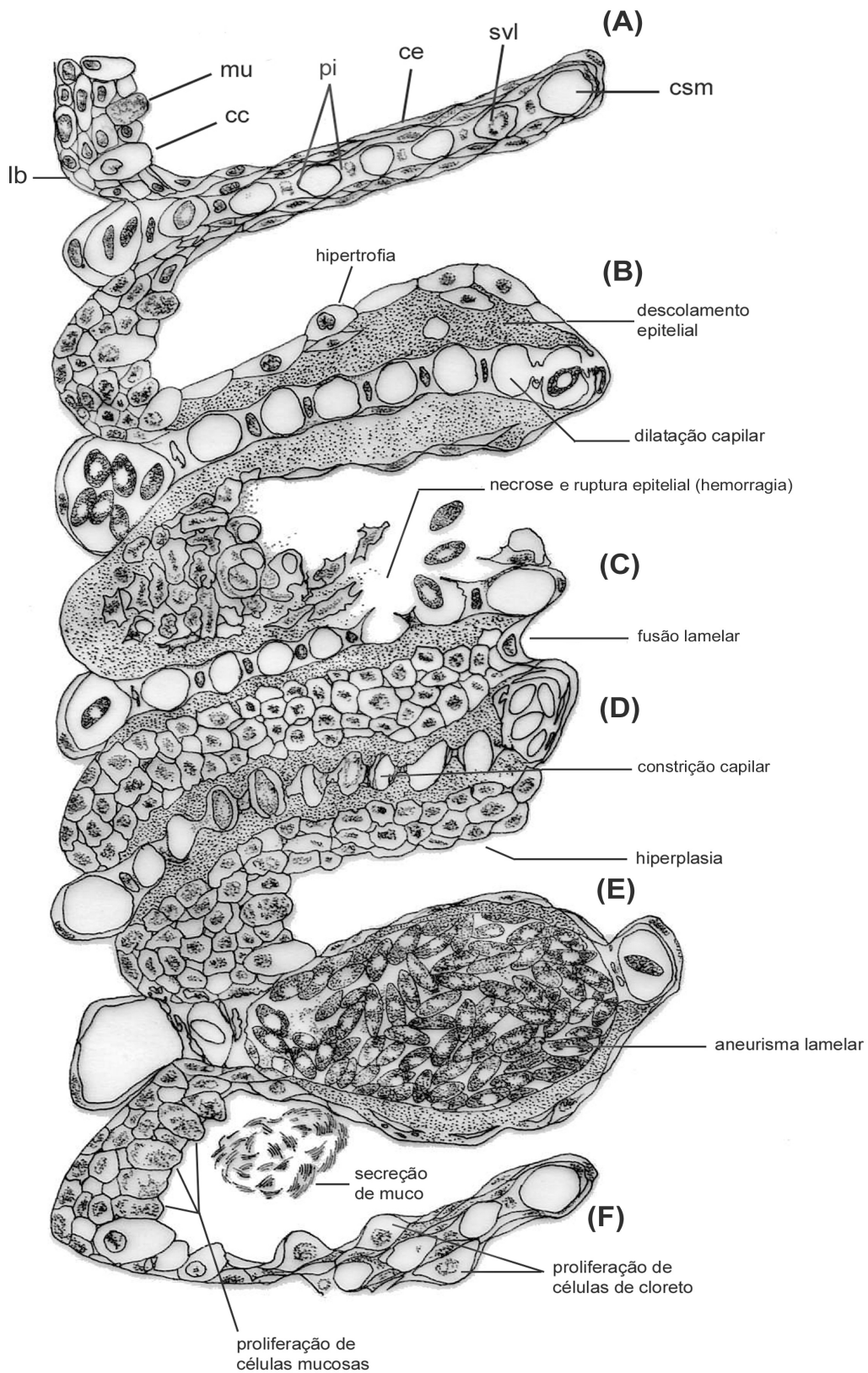


Figura 9. Diagrama esquemático das lesões branquiais mais comuns. (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; cc = célula-cloreto; mu = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sanguíneo marginal (Machado, 1999, modificada de Mallat, 1985).

A CC são ionócitos especializados e os principais locais de troca iônica em brânquias (Hwang et al., 2007). Essas células são ricas em unidades da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) na membrana basolateral, refletindo seu poder ativo no transporte iônico.

A imunomarcção permite a localização dessas células e a intensidade de atividade da Na^+/K^+ -ATPase, de acordo com a quantidade de unidades presentes, e pode ser um excelente biomarcador para os processos osmorregulatórios em brânquias de peixes (Shikano e Fujio, 1998). Por sua vez, a superfície apical das células-cloreto também tem sido amplamente utilizada para avaliar as respostas ou alterações dessas células às condições ambientais (Laurent, 1984; Pisam e Rambourg, 1991; Wilson e Laurent, 2002). Dependendo das características físicas e químicas da água, pode ocorrer um aumento ou diminuição das células mucosas. Sabe-se que a proliferação e hipersecreção das células mucosas envolvidas com o sistema de defesa dos peixes frente ao agente exposto podem comprometer a função branquial, dependendo da severidade do processo (Fracácio et al., 2003). Dessa forma, a quantificação de células mucosas e tipo de mucina presente na secreção podem ser considerados como indicadores da qualidade da água.

1.4 A espécie *Prochilodus lineatus*

Pertencente à família Prochilodontidae, o gênero *Prochilodus* destaca-se pela ampla distribuição na região neotropical e possui 13 espécies descritas até o momento (Reis et al., 2003). Todas as espécies possuem corpo de porte médio a grande e iliofagia (detritívoros), reofilia (dependem da correnteza do ambiente) e capacidade migratória no período de piracema. A espécie *Prochilodus lineatus*, o curimatá (Figura 10), é também conhecida como curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimbotá. Essa espécie possui desova única por temporada e grande número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidados parental (Lowe-McConnell, 1999).



Figura 10. Exemplar de *Prochilodus lineatus*, curimatá (foto: Marcelo G. Paulino)

Os peixes *P. lineatus* se encontram distribuídos particularmente em toda bacia do rio Paraná-Paraguai e rio Paraíba do Sul (na região sudeste do Brasil) (Castro, 1990). É uma espécie economicamente importante, principalmente como fonte de subsistência de populações ribeirinhas como a pesca comercial (Cazenave et al., 2009) e tem sido reproduzida em larga escala em pisciculturas, pois suas larvas servem de alimentos a espécies carnívoras como o dourado (*Salminus maxillosus*) (Órfão, 2006). Segundo a classificação de Valenciennes (1836), a espécie ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Subordem: Characoidei

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

Por também ser uma espécie detritívora, encontra-se em contato direto com poluentes tanto na água como no sedimento. Alguns trabalhos mostraram que essa espécie é muito sensível a diferentes contaminantes e por essa razão é considerada potencialmente adequada para monitoramento ambiental (Mazon e Fernandes, 1999; Da Silva et al., 2004; Martinez et al., 2004; Almeida et al., 2005; Camargo e Martinez, 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Tendo em vista que o herbicida atrazina é um dos mais utilizados na agricultura e as brânquias dos peixes estão em contato íntimo com os contaminantes dissolvidos na água, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial toxicológico da atrazina em concentrações subletais sobre as brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* utilizando biomarcadores bioquímicos, fisiológicos e morfológicos durante exposição aguda e subcrônica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as respostas dos sistemas de defesas antioxidantes em brânquias de *P. lineatus* expostos à atrazina durante 48 h ou 14 d e determinar os efeitos da atrazina sobre a produção de hidroperóxidos de lipídeos.
- Avaliar os efeitos na osmorregulação e no equilíbrio iônico de *P. lineatus* expostos a atrazina durante 48 h ou 14 d.
- Avaliar, através de análises histopatológicas, o efeito da atrazina nas brânquias de *P. lineatus* em exposição por 48 h ou 14 dias.
- Avaliar o potencial toxicológico da atrazina sobre a densidade das células-cloreto e células mucosas branquiais de *P. lineatus* expostos à atrazina por 48 h ou 14 d.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Exemplares de curimatá, *Prochilodus lineatus* (n=80), juvenis [Massa corpórea (M_c) = $29,3 \pm 2,8$ g e comprimento total (Ct) = $13,7 \pm 0,6$ cm] foram provenientes da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil. Os animais foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (LZBC) de Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos.

Os peixes foram aclimatados, em torno de 30 dias, em tanques de 1000 L, com aeração e fluxo contínuo de água sem cloro. A água foi mantida a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e o fotoperíodo natural (~12:12 horas). Eles foram alimentados diariamente *ad libitum* com ração comercial (40% de proteína). Os parâmetros da qualidade da água foram monitorados e mantiveram-se em: oxigênio dissolvido ($7.0-7.5$ mg.L⁻¹), pH (7,1-7,4), condutividade ($125-130$ $\mu\text{S.cm}^{-1}$), alcalinidade ($35-43$ mg.L⁻¹ CaCO₃) e dureza total ($39-50$ mg.L⁻¹ CaCO₃).

3.2 Delineamento Experimental

Os peixes foram divididos aleatoriamente em oito grupos e após aclimação por 24 horas. Cada grupo de peixes (n = 10) foi colocado em aquário (200 L) e mantido por 48 horas ou 14 dias em sistema semi-estático com renovação a cada 48 horas. Para cada tempo de exposição, um grupo controle (C) foi mantido em água do laboratório e os demais foram expostos à atrazina (Sigma, CAS n°: 1912-24-9) nas seguintes concentrações: 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (máxima permitida na água pela resolução CONAMA

357/2005), $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (aproximadamente a concentração intermediária da aplicada na agricultura) e $25 \mu\text{g.L}^{-1}$, que é indicada para o uso da agricultura (Ventura et al., 2008).

As concentrações de atrazina foram obtidas de uma solução estoque preparada em metanol a 10mg.mL^{-1} . Os parâmetros da água, temperatura e o fotoperíodo foram medidos como descritos na aclimação. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (Protocolo nº 004/2009) e Ambiental local (Protocolo nº013/2009).

3.3 Coleta de Amostras

No final do período de 48 horas ou 14 dias, amostras de sangue (0,5 a 1 mL) foram obtidas via punção caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas e em seguida, os peixes foram medidos, pesados e imediatamente sacrificados por secção medular. Posteriormente, as brânquias foram cuidadosamente removidas e lavadas em solução de salina fisiológica (NaCl 0,9%), os arcos branquiais foram separados e amostras foram fixadas, por 24 h, em solução de glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,3) para análises histopatológicas e de microscopia eletrônica de varredura, e em solução de Bouin (ácido pícrico; formaldeído e ácido acético glacial) para análises histoquímica de células mucosas e imunohistoquímica de células-cloreto. Outra parte das amostras foi congelada a -80°C , em tampão SEI (Sacarose 0,3M-EDTA 0,0001M-Imidazol 0,03M, pH 7,4), para determinação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e congeladas a -80°C para determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

3.4 Análises Plasmáticas

3.4.1 Separação do Plasma

As amostras de sangue foram centrifugadas a uma velocidade de 11,235 xg a 4°C por 5 minutos. O plasma foi removido e congelado a -80 °C para análise da osmolaridade e concentração iônica plasmática.

3.4.2 Determinação da Osmolalidade Plasmática Total

Para determinação da osmolalidade plasmática total foi utilizado 50 μL do plasma. A análise foi realizada em um semi-microsmômetro ($\mu\text{OSMETTE PRECISION SYSTEM}$), que tem como base o ponto de congelamento. A osmolaridade foi expressa em mOsmol.Kg^{-1} .

3.4.3 Determinação da Concentração dos Íons Plasmáticos

As concentrações dos íons Na^+ e K^+ foram determinadas utilizando um fotômetro de chama (DIGMED DM-61). Para isso foi utilizado 30 μl do plasma diluídos em 3 mL de água destilada (1:100). A concentração de íons Cl^- foi determinada utilizando um kit comercial (LABTEST) com absorvância de $\lambda = 490 \text{ nm}$, em uma leitora de microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK.).

As concentrações de íons plasmáticos foram expressas em mEq.L^{-1} .

3.5 Análises Bioquímicas

3.5.1 Preparação do Homogêinizado

Depois de descongelados, os filamentos branquiais foram separados e homogêinizados (1:3 m/v) por maceração em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) e centrifugados a 11000 xg por 5 minutos a 4°C para determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo.

Para a atividade da enzima NKA, os filamentos branquiais foram separados e homogêinizados (1:2 m/v) por maceração em tampão SEI + β -mercaptoetanol e centrifugados a 11000 xg por 5 minutos a 4°C.

3.5.2 Determinação da Proteína Total

O teor da proteína total da brânquia foi determinado segundo o método de Bradford utilizando Coomassie brilliant blue G-250 (Bradford, 1976), adaptado para leitura em microplaca (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK), conforme descrito por Kruger (1994) e albumina bovina como padrão. A absorvância das amostras foi medida em $\lambda = 595$ nm. Os valores de proteína foram utilizados para expressar a atividade das enzimas antioxidantes e atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase.

3.5.3 Determinação das enzimas antioxidantes

3.5.3.1 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido, segundo a metodologia de McCord e Fridovich (1969). Como referência, 1 mL de uma mistura reativa (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM; xantina 1mM; NaOH 0,001 M) mais 40 µl de xantina oxidase foi utilizada para absorvância padrão de 0,025 abs.min⁻¹. Para as amostras, adicionou-se 10 µl da amostra e as leituras foram feitas em $\lambda = 550$ nm. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C, uma vez que a SOD dismuta o radical superóxido em H₂O e H₂O₂. A atividade da enzima foi expressa em U SOD.min⁻¹.mg proteína⁻¹.

3.5.3.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio em $\lambda = 240$ nm, segundo a metodologia de Beutler (1975). A redução foi medida durante um minuto em cubeta contendo 1 mL de solução recém preparada de H₂O₂ em água destilada (30%), tampão da catalase (tris 1M; EDTA 5mM) e 10 µl da amostra. A reação foi iniciada na adição do peróxido de hidrogênio. A atividade da enzima foi expressa em µmol H₂O₂ metabolizado. min⁻¹.mg proteína⁻¹.

3.5.3.3 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH + H⁺ em presença do peróxido de hidrogênio em $\lambda = 340$ nm.

Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1 mL de meio de reação (NADPH, azida sódica 5 mM, GSH, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0) juntamente com 20 μ l de glutathiona redutase (GR), 20 μ l de H₂O₂ 20 mM e 10 μ l de amostra. A GPx presente na amostra degrada o H₂O₂ na presença de GSH. A atividade da enzima foi expressa em μ mol NADPH oxidado. min⁻¹.mg proteína⁻¹.

3.5.3.4 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida de acordo com Keen et al (1976), utilizando-se 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura reativa continha 100 mM de CDNB em etanol 100%, 100 mM de GSH, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH7,0) e extratos enzimáticos. Utilizou-se 990 μ L da mistura e 10 μ L de amostra. A formação do aduto glutathiona-2-4-dinitrobenzeno foi monitorada pelo aumento da absorbância a 340 nm contra um branco (sem amostra). O coeficiente de extinção molar de 9,6 mM⁻¹.cm⁻¹ foi utilizado para o cálculo da atividade da enzima.

A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto por minuto por miligrama de proteína.

3.5.3.5 Determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH)

A concentração de tióis não protéicos, incluindo a GSH foi determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963), utilizando o reativo de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico – DTNB), adaptada por Wilhelm-Filho (1996) e Wilhelm-Filho et al. (2005).

As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:1) e após centrifugação (5,62 *xg*, 4°C, 15 minutos) para precipitar as proteínas, o sobrenadante foi utilizado para analisar o conteúdo de GSH. Aos sobrenadantes foi adicionado um tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH8,0), contendo 0,25 mM de DTNB (1:1). A formação do ânion tiolato resultante da reação da GSH com o reativo de Elmann, foi determinada em espectrofotômetro a $\lambda = 412$ nm.

O conteúdo de GSH foi expresso em $\mu\text{g GSH.mg proteína}^{-1}$, a partir de uma curva padrão de GSH.

3.5.3.6 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi quantificada pela oxidação do Fe^{+2} (sulfato ferroso amoniacal – FeSO_4) a Fe^{+3} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjado xilenol (Ferrous Oxidation-Xylenol Orange) como descrito por Jiang e colaboradores (1991).

Cerca de 100 μl de amostra foram tratados com TCA 10% na proporção 1:1 e centrifugados a 5,62 *xg* a 4°C por 10 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente com 900 μl de mistura reativa (alaranjado xilenol 100 μM ; FeSO_4 250 μM ; ácido sulfúrico 25 mM; butilato hidroxitolueno 4mM; diluídos em metanol 90%).

O Fe^{+3} formado na presença dos hidroperóxidos reage com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido, com um pico de absorção em 560 nm (comprimento de ondas que as leituras foram realizadas no espectrofotômetro). As

concentrações de LPO foram determinados em 560 nm e expressas em μM hidroperóxido de cumeno.mg de proteína⁻¹ a partir de uma curva padrão para o hidroperóxido de cumeno (CHP).

3.5.4 Determinação da atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase branquial

A atividade específica da enzima Na⁺/K⁺-ATPase foi determinada em frações de homogenados pelo método descrito por Quabius et al. (1997) e adaptado para microplaca por Nolan (2000). A técnica consiste em quantificar a concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberado pelo funcionamento da bomba.

Utilizou-se 7 μl do sobrenadante em cada poço da microplaca e adicionado 100 μl de tampão imidazol 30mM (pH7,4), contendo 3mM de Na₂ATP (vanadium free) Posteriormente, aos poços de cada amostra foram adicionados 100 μl de tampão de incubação (NaCl 100 mM; MgCl₂ 8 mM; imidazol 30 mM e EDTA 0,1 mM) contendo KCl (1mg.mL⁻¹) ou oubaína (1mg.mL⁻¹). O padrão usado foi o cálcio-fosfato que tem a quantidade de Pi conhecida (10/5 mg/dL).

As microplacas foram incubadas por 60 minutos a 25 °C no escuro e a reação foi interrompida pela adição de 200 μl de uma mistura contendo TCA 8,6% e reagente de cor (0,66 mM H₂SO₄; 9,2 mM de molibdato de amônia; 0,33 mM de FeSO₄). A leitura foi feita em $\lambda = 595$ nm em leitora de microplacas (Dynex Technologies Ltd., MRXTC, UK.) e a atividade da enzima expressa em $\mu\text{M.Pi.mg.proteína.h}^{-1}$.

3.6 Procedimentos Histológicos

3.6.1 Imunohistoquímica de Células-Cloreto (contra Na⁺/K⁺-ATPase)

Após fixadas, as amostras foram desidratadas em bateria crescente de etanol (50-100%), diafanizadas em xilol (100%) e incluídas em parafina histológica. Cortes longitudinais (8 µm) foram realizados em micrótomo (Micron HM 360) para rotina de imunohistoquímica de células-cloreto. As secções foram desparafinizadas em xilol 100% (2x) por 5 minutos e hidratadas em bateria decrescente de etanol (100-50%) por 3 minutos.

Os cortes histológicos foram lavadas (2x) em tampão salino Tris base + triton 0,5 mM pH 7,4 (TBS-T) diluído (1:10) por 10 minutos com agitação contínua. As laminas foram escorridas e as amostras foram pré-incubadas (em câmara úmida) com soro normal de cabra 20% - NGS (Normal Goat Serum – Gibco Invitrogen) por 20 minutos, para bloquear sítios de ligação não específicos. A incubação com o primeiro anticorpo (α5) anti Na⁺/K⁺-ATPase (diluído 1:300) (adquirido da Universidade de Iowa USA) foi 'overnight' em câmara úmida a 20 °C.

No dia seguinte, as secções foram lavadas novamente em TBS-T e incubados com o segundo anticorpo anti-rato com peroxidase conjugada - GAMPO (Goat anti-mouse Peroxidase - Chemicon international, USA) diluído (1:100) por 1 hora. Após a incubação, foi realizada uma lavagem com tampão salino Tris base (TB) diluído (1:10). O complexo foi visualizado utilizando a coloração com 3,3'-diaminobenzidina + Sulfato níquel amoniacal (DAB-Ni) e H₂O₂. A coloração foi interrompida em água destilada (2x) por 10 minutos.

As lâminas foram finalizadas usando Entellan e analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 em microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Denmark) com a contagem de células cloreto no filamento e lamelas (por mm² de epitélio) em 25 campos aleatórios.

3.6.2 Determinação de Densidade e Área Fracional de Células-Cloreto

Para as análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3), lavadas no mesmo tampão e desidratadas em série crescente de etanol (50 a 100%). Em seguida, as amostras foram desidratadas em 1,1,1,3,3,3-hexadimetildisilazano (HMDS) a temperatura ambiente para secagem completa.

Após a secagem, as amostras foram coladas com cola adesiva de prata (Degusa) em suportes de alumínio apropriados para o microscópio eletrônico de varredura. Posteriormente, as amostras receberam uma camada de ouro (Degusa 99%), em um Sputtering FCD 004 BAUSER a vácuo. As amostras foram então observadas em microscópio eletrônico de varredura (PHILIPS – TMP) em 2500 x, distância de trabalho de 10 µm e a 20 kV. As imagens armazenadas digitalmente para posterior análise morfológica da superfície epitelial das células pavimentosas branquiais e características das células de cloreto.

Para determinação da densidade e área fracional das células-cloreto (AFCC), usou-se 5 campos aleatórios e não contínuos do filamento, de acordo com a metodologia de Bindon et al. (1994a e 1994 b) e Moron et al. (2003). Utilizando o software Motic Image plus 2.0, os perímetros de cada imagem e de cada CC (totalmente ou parcialmente visíveis) foram delineados e a área ocupada por cada célula e a área fracional das células de cloreto por mm² de filamento foram calculadas de acordo com as equações:

$$AFCC = \Sigma \text{ área de todas as CC} / \text{área da fotografia}$$

$$\text{Densidade} = AFCC / \text{Média das áreas das CC}$$

3.6.3 Histoquímica de Células Mucosas

Após fixadas em solução de Bouin e lavadas em álcool 50% para remover o excesso de corante, as amostras foram desidratadas em bateria crescente de etanol (50-100%), diafanizadas em xilol (100%) e incluídas em parafina histológica. Cortes transversais (6 µm) foram realizados em micrótomo (Micron HM 360) para rotina de histoquímica de células mucosas. As secções foram desparafinizadas em xilol 100% (2x) por 5 minutos e hidratadas em bateria decrescente de etanol (100-50%) por 3 minutos.

Para determinar as mucinas presentes nas CMs, foi utilizada a reação do ácido periódico de Schiff (PAS) + Azul de Alcian (AB) pH 2,5 ou pH 1,0. As lâminas foram submetidas a reação com AB por 30 minutos e em seguida com PAS por 15 minutos, em ambos pH. Para interromper a reação histoquímica utilizou-se água sulfurosa (metabissulfito de sódio 5%; HCl) por 10 segundos e lavagem em água destilada.

Mucosubstâncias contendo hexoses e ácidos siálicos (McManaus, 1948) são PAS positivas (PAS+) e foram denominadas como CM tipo 1. As mucinas AB positivas (AB+) contêm substâncias sulfatadas e ácidas (pH 2,5) ou sulfatadas (em pH 1,0) (Lev e Spicer, 1964; Mowry, 1956; Pearse, 1985) e foram denominadas como CM tipo 2 e CM tipo 3, respectivamente. As CM contendo todas as mucinas conjugadas são AB e PAS positivas (AB-PAS +) independente do pH e foram denominadas CM tipo 4.

A quantificação de células mucosas e identificação das glicoproteínas foram baseadas na coloração das reações histoquímica contra o *background*. As lâminas foram finalizadas com Entellan e analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 em microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Denmark) com a contagem de células mucosas no filamento em 10 campos aleatórios.

3.6.4 Análises Histopatológicas

Após a fixação em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3), as amostras foram desidratadas em bateria crescente de etanol (70-95%) por 1 hora cada e, em seguida, embebidas em etanol 95% e historesina pura (Leica, Alemanha) durante 4 horas. Posteriormente, as amostras ficaram 'overnight' em historesina pura para posterior inclusão.

Após inclusão, cortes histológicos foram confeccionados longitudinalmente a 3 µm em micrótomo (Micron HM 360), coradas com Azul de Toluidina e utilizadas para análises histopatológica de brânquias. As lâminas foram finalizadas utilizando Entellan.

A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias foi avaliada semi-quantitativamente de duas formas:

A) Cálculo do valor médio de alteração (VMA):

O VMA está associado à incidência e distribuição de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para isso, atribuiu-se um valor numérico, de acordo com a distribuição das alterações para cada animal conforme a escala:

grau 1: ausência de alteração histopatológica,

grau 2: ocorrência de lesões pontualmente localizadas

grau 3: lesões amplamente distribuídas pelo órgão

B) Cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH):

O IAH foi calculado de acordo com a frequência e severidade de cada alteração histológica (lesão). As lesões foram classificadas em estágios progressivos quanto ao comprometimento da função tecidual (Tabela 2),

segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) e modificada por Silva (2004). Esses dados foram utilizados para os cálculos de IAH através da seguinte fórmula:

$$IAH = 10^0 \cdot \Sigma I + 10^1 \cdot \Sigma II + 10^2 \cdot \Sigma III$$

Onde ΣI , ΣII e ΣIII corresponde ao número total de alterações em cada estágio, e 10^0 , 10^1 e 10^2 são fatores para o cálculo do IAH, segundo a severidade da lesão.

Tabela 2. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento da função branquial.

Estágios		
I	II	III
Hipertrofia do epitélio lamelar	Fusão total das lamelas	Necrose
Hiperplasia do epitélio lamelar	Aneurisma lamelar	
Congestão vascular	Ruptura epitelial	
Dilatação do canal marginal		
Descolamento epitelial		
Constricção do sistema de células pilares		
Proliferação de células-cloreto		
Proliferação de células mucosas		
Fusão parcial das lamelas		
Edema		

Os valores de IAH entre 0 e 10 indicam um funcionamento normal do órgão; de 11 a 20 indicam danos leves a moderados no órgão; entre 21 e 50 indicam danos moderados a severos e os valores acima de 100 danos irreparáveis no tecido.

As lâminas foram analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 em microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Denmark).

3.7 Análises Estatísticas

Os resultados estão apresentados como média \pm erro-padrão da média. Após submetidos ao teste de normalidade (D'Agostino & Pearson), as diferenças entre os animais expostos em relação aos animais controle foram detectadas por análise de variância (ANOVA) one-way, seguida pelo pós-teste de *Bonferroni*, utilizando software GraphPad Prism 5.0. Diferenças estatisticamente significante foram consideradas quando $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4 RESULTADOS

4.1 Atividade das Enzimas Antioxidantes e Peroxidação Lipídica

Em relação ao controle, os animais expostos por 48 horas não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros enzimáticos de defesa antioxidantes da superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, entretanto em 14 dias a atividade da SOD e CAT aumentaram 42% e 66%, respectivamente, no grupo exposto a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 11).

Nas brânquias dos animais expostos a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ a atividade da glutathione S-transferase aumentou 135% em relação ao controle quando os animais foram expostos por 14 dias (Figura 12 C). O conteúdo do dissulfeto de glutathione não apresentou diferença significativa em nenhum período de exposição (Figura 12).

A concentração da LPO no grupo exposto a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ aumentou significativamente (81%) em relação ao grupo controle dos animais expostos por 14 dias, em 48 horas não houve diferença significativa (Figura 13).

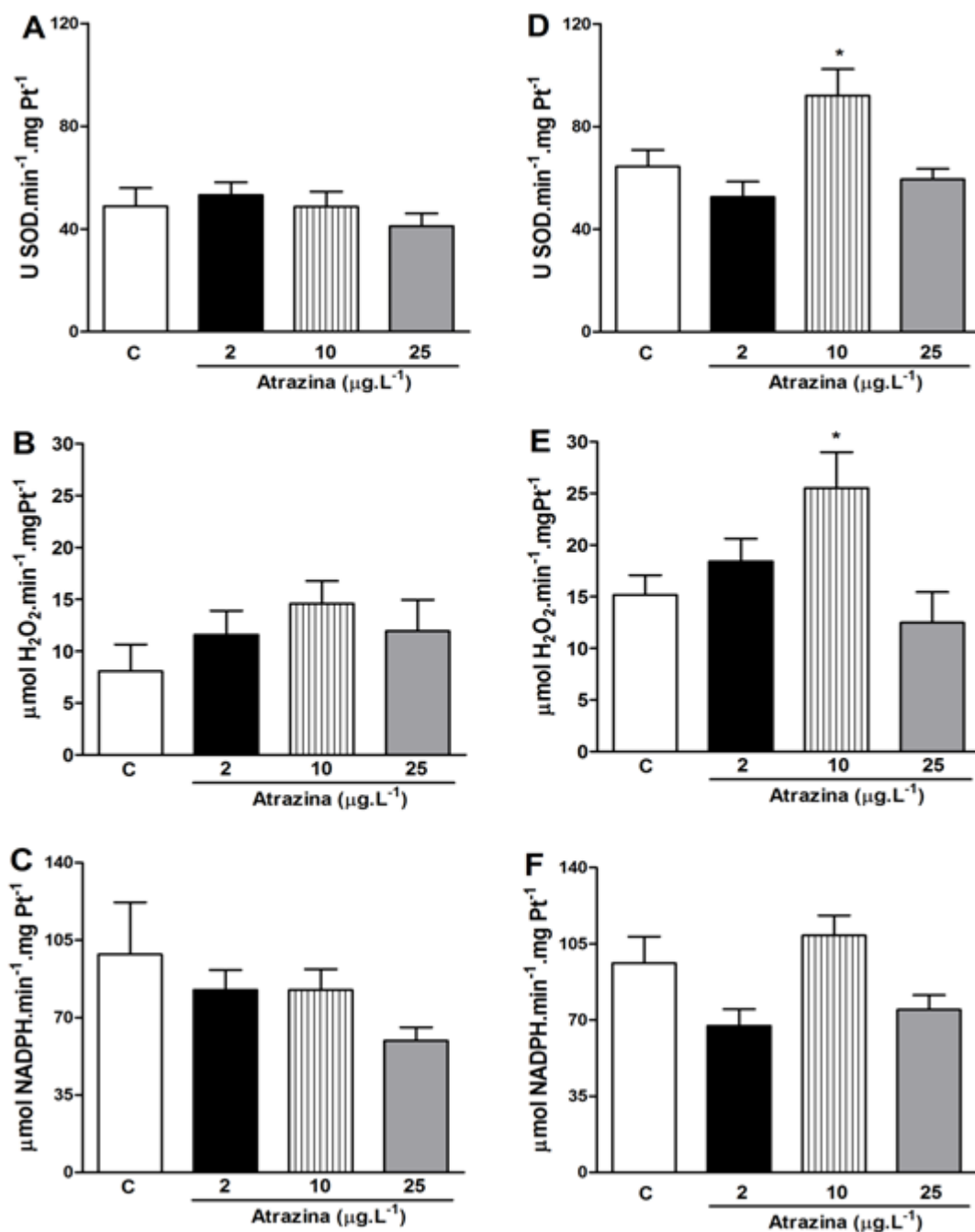


Figura 11. Atividade da superóxido dismutase (SOD) (A); catalase (CAT) (B); glutiona peroxidase (GPx), em 48 horas de exposição e da superóxido dismutase (D); catalase (E); glutiona peroxidase (F), em 14 dias de exposição, nas brânquias de *Prochilodus lineatus* do grupo controle (c) e grupos expostos a 2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina. * Indica diferença estatística ($P > 0,05$) em relação ao controle.

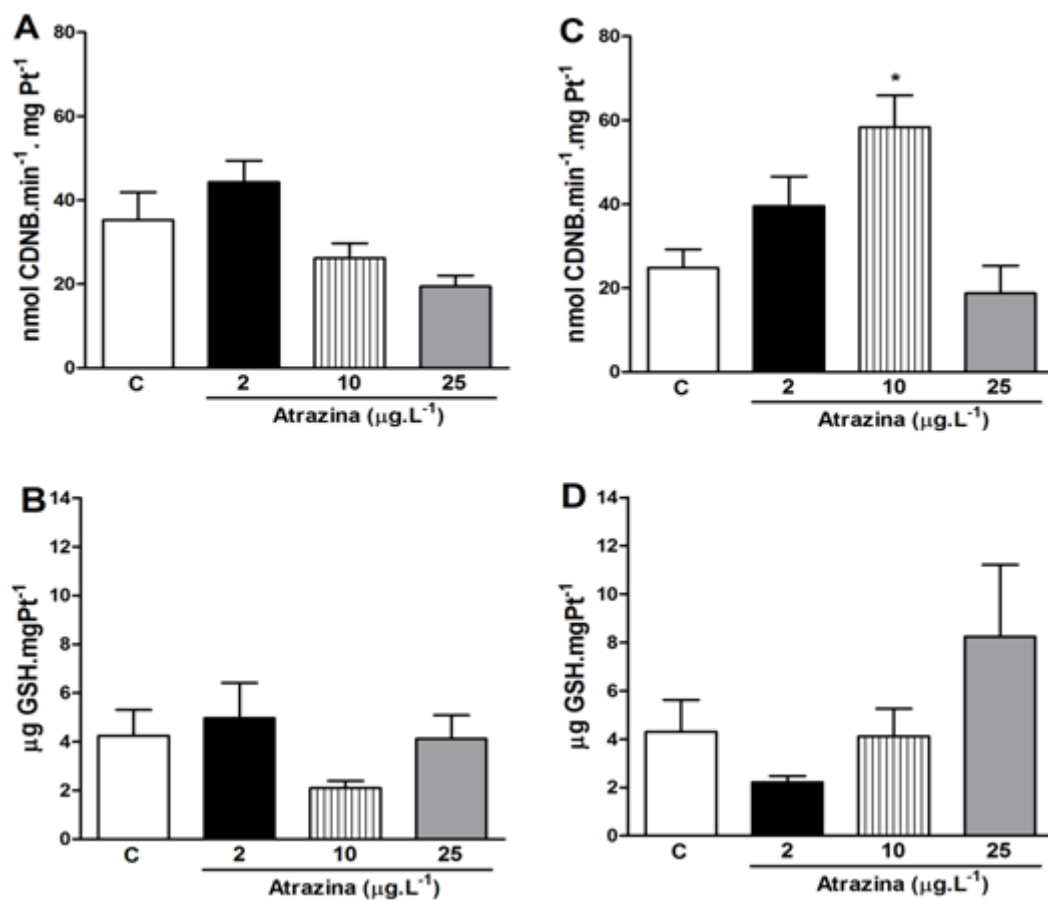


Figura 12. Atividade da glutathione s-transferase (GST) (A) e concentração do dissulfeto de glutathione (GSH) (B) expostos por 48 horas e a atividade glutathione s-transferase (C) e concentração do dissulfeto de glutathione (D) expostos por 14 dias, nas brânquias de *Prochilodus lineatus* do grupo controle (c) e grupos expostos a grupos expostos a 2, 10 e 25 µg.L⁻¹ de atrazina. * Indica diferença estatística (P>0,05) em relação ao controle.

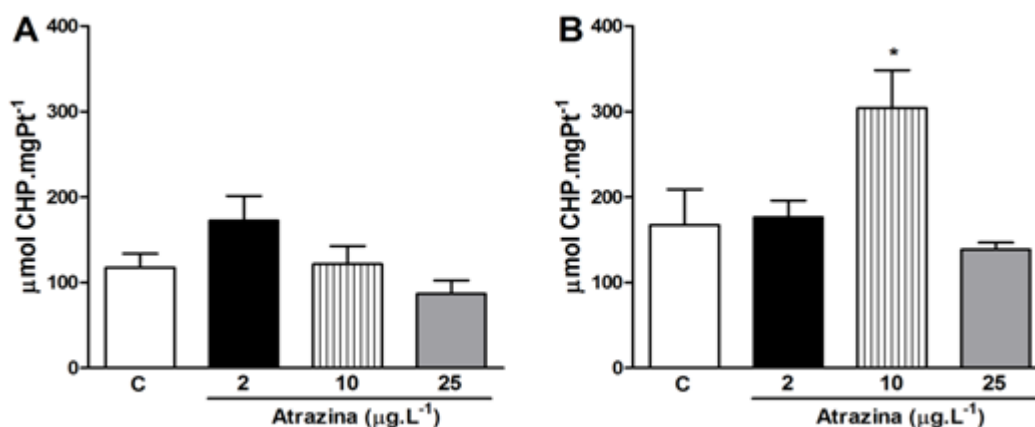


Figura 13. Concentração de hidroperóxido de cumeno (CHP) na peroxidação lipídica (LPO) em brânquias de *P. lineatus* expostos a um grupo controle (c) e expostos 2, 10 e 25 µg.L⁻¹ de atrazina por 48 horas (A) ou 14 dias (B). * Indica diferença estatística (P>0,05) em relação ao controle.

4.2 Histopatologia de brânquias

A estrutura normal do epitélio lamelar está representada pela figura 14 A, onde se nota uma fina camada de revestimento formada pelas células pavimentosas (CPVs). As principais patologias encontradas em brânquias de *P. lineatus* estão apresentadas na figura 14 de B a F. Em 48 horas, as patologias mais frequentes foram hipertrofia do epitélio lamelar, hiperplasia do epitélio lamelar, congestão vascular e constrição do sistema de células pilares, enquanto que em 14 dias, as mais freqüentes foram hipertrofia do epitélio lamelar, congestão vascular e ruptura epitelial.

A freqüência e o tipo de alteração nas brânquias dos animais expostos à atrazina por 48 horas ou 14 dias estão representados pela tabela 3 e 4 respectivamente. As alterações histopatológicas mais freqüentes em ambos os períodos de exposição são classificadas como estágio I.

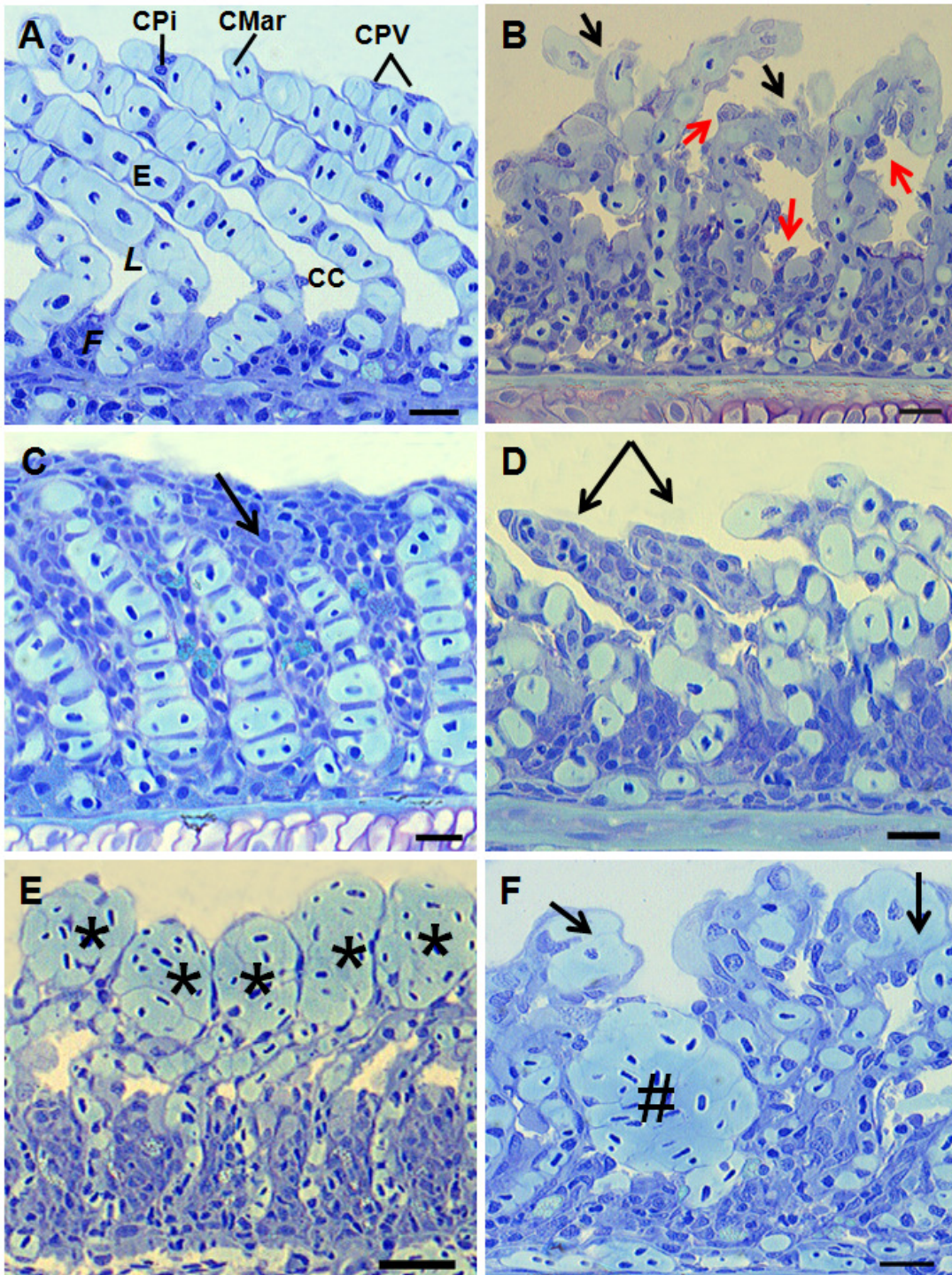


Figura 14. Histopatologia em brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina. (A) Estrutura branquial normal indicando suas respectivas estruturas; (B) seta vermelha indica hipertrofia do epitélio lamelar e setas pretas, ruptura epitelial; (C) Hiperplasia e fusão de varias lamelas; (D) Constricção do sistema de células pilares; (E) * indica os aneurismas lamelar e (F) Setas indicam dilataçãõ do canal marginal e # indica congestão vascular. Abreviações: CMar = canal marginal; CPV = células pavimentosas; E = eritrócito; CPi = células pilares; CC = células-cloreto; L= lamela e F= filamento. Barra de escala = 20 µm. Coloraçãõ = Azul de Toluidina.

Tabela 3. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 48 horas.

Alteração	Estágio	Controle	Atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
			2	10	25
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	++	+++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0	0+	+	0+
Congestão vascular	I	+	+++	++	0+
Constricção do sistema de células pilares	I	+	0+	+	+
Proliferação de células mucosas	I	0	0	0+	0
Fusão parcial das lamelas	I	0	0	0+	0+
Aneurisma lamelar	II	0+	+	0	0
Ruptura epitelial	II	0+	0+	++	++

0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente

Tabela 4. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 14 dias.

Alteração	Estágio	Controle	Atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		
			2	10	25
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	++	+++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0	+	0+	0+
Congestão vascular	I	0	++	0+	+++
Dilatação do canal marginal	I	0	0	0+	0
Constricção do sistema de células pilares	I	0	0	0	++
Fusão parcial das lamelas	I	0	0	0	0+
Aneurisma lamelar	II	0	0+	0+	+
Ruptura epitelial	II	+	++	++	+

0 = ausente; 0+ = raramente presente; + = pouco freqüente; ++ = freqüente; +++ = muito freqüente

As análises histopatológicas em brânquias de animais expostos a 2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 horas apresentaram uma freqüência maior de lesões em relação ao controle. Entretanto, o cálculo do índice de alteração histopatológica (IAH) resultou em um valor próximo a 10 e os grupos expostos não apresentaram diferença significativa em relação aos grupos controle. O valor médio de alteração foi próximo de 2. Esses resultados indicam que as lesões estavam pontualmente localizadas e, dessa forma, o órgão tem funcionamento normal (Figura 15).

Em 14 dias, os grupos expostos apresentaram uma maior freqüência de lesões que os animais controle. O IAH do grupo exposto a 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina foi significativamente diferente do controle, indicando danos leves a moderados no epitélio branquial desses animais. O VMA do grupo exposto a 2 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi igual a grau 2, indicando que nesses grupos as lesões estavam pontualmente localizadas (Figura 16)

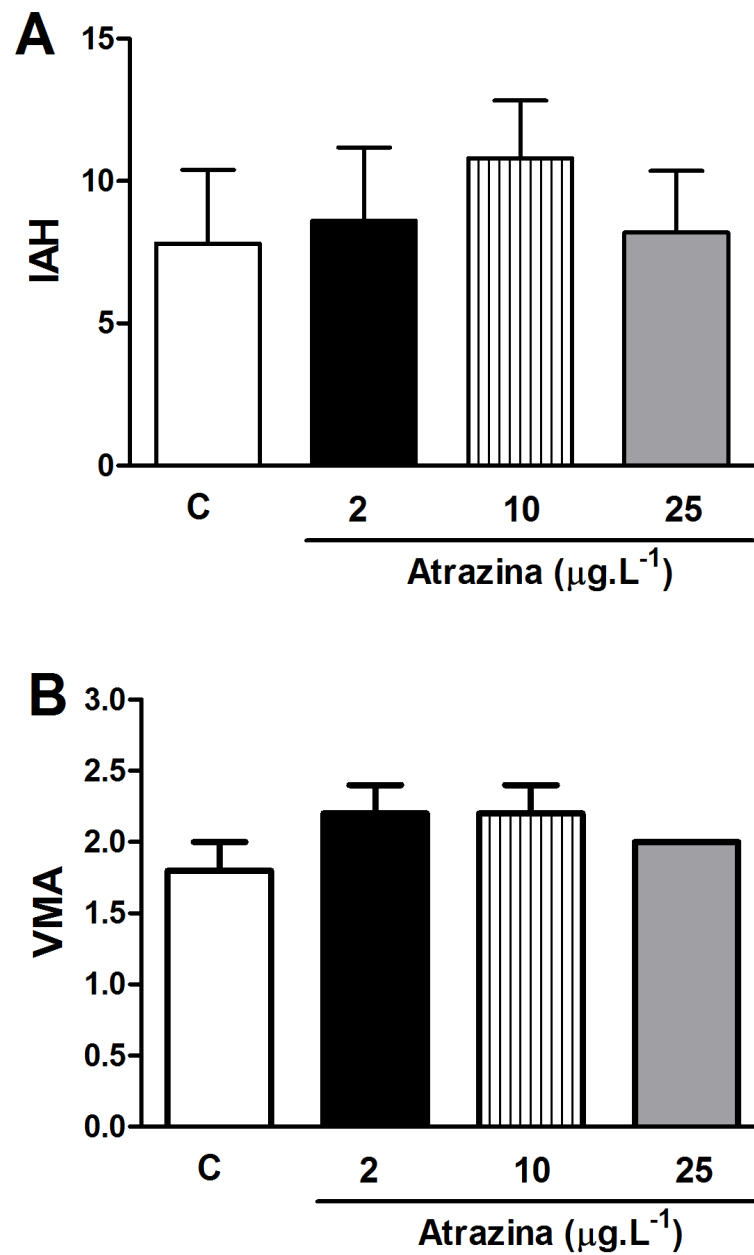


Figura 15. (A) Índice de alteração histopatológica (IAH) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 48 horas. (B) Valor médio de alteração.

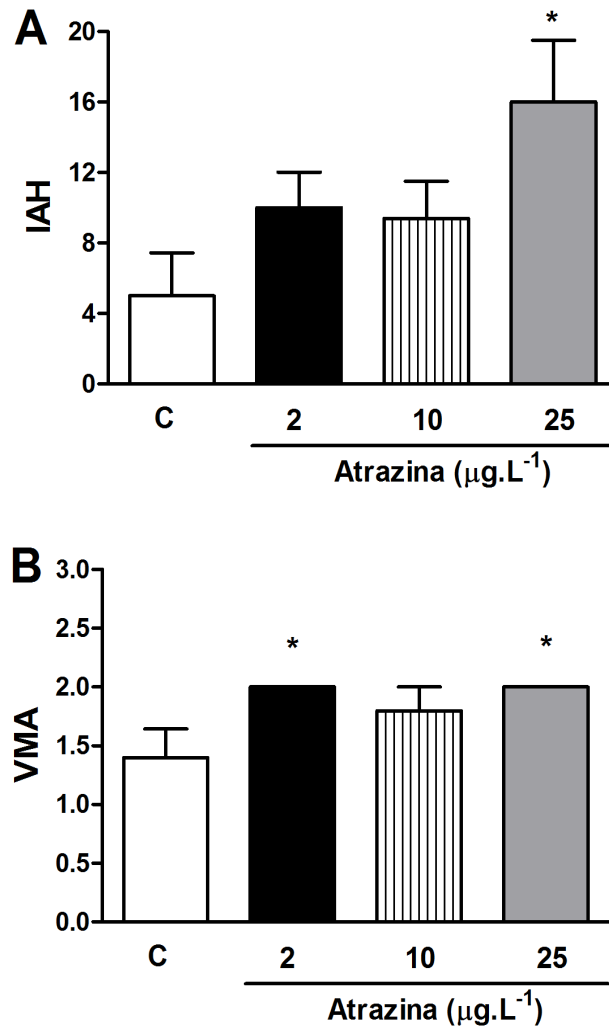


Figura 16. (A) Índice de alteração histopatológica (IAH) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina por 14 dias. (B) Valor médio de alteração. * indica diferença estatística ($P < 0,05$) em relação ao controle.

4.3. Células Pavimentosas e Células-Cloreto

A superfície branquial é constituída, principalmente, pelas células pavimentosas (CPV) que, próximo à base das lamelas apresentam sempre o mesmo padrão: superfície convexa e presença de microdobras na sua região apical, tanto no grupo controle de 48 horas (Figura 17 A) quanto no grupo controle de 14 dias

(Figura 17 C). Apesar das mesmas características, as CPV nos grupos expostos a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 h ou 14 dias (Figura 17 B e 17 D, respectivamente) apresentaram delimitações mais definidas com a presença de microdobras mais longas em relação aos respectivos controles.

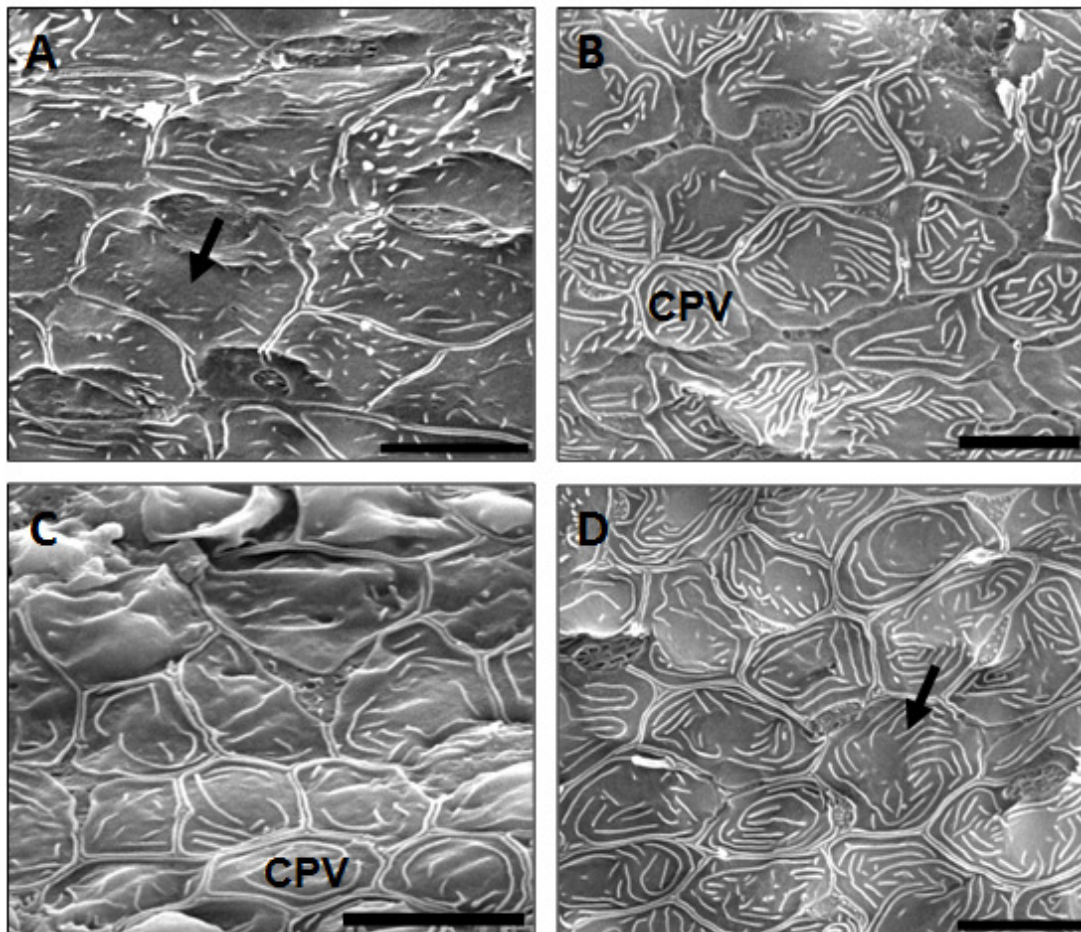


Figura 17. Eletromicrografias de varredura da superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) grupo controle e (B) grupo exposto a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 horas. (C) Controle e (D) $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ expostos por 14 dias. Setas pretas mostram a diferença entre os padrões das microdobras das células pavimentosas (CPV) entre o grupo exposto e o grupo controle. Escala = $10 \mu\text{m}$.

As células-cloreto (CC) diferem das CPVs por apresentarem a membrana apical côncava, com projeções no epitélio apical, conferindo a elas um aspecto de esponja. Em todos os grupos (controle e expostos), essa região apresentou um mesmo padrão, independente do período de exposição à atrazina (Figura 18).

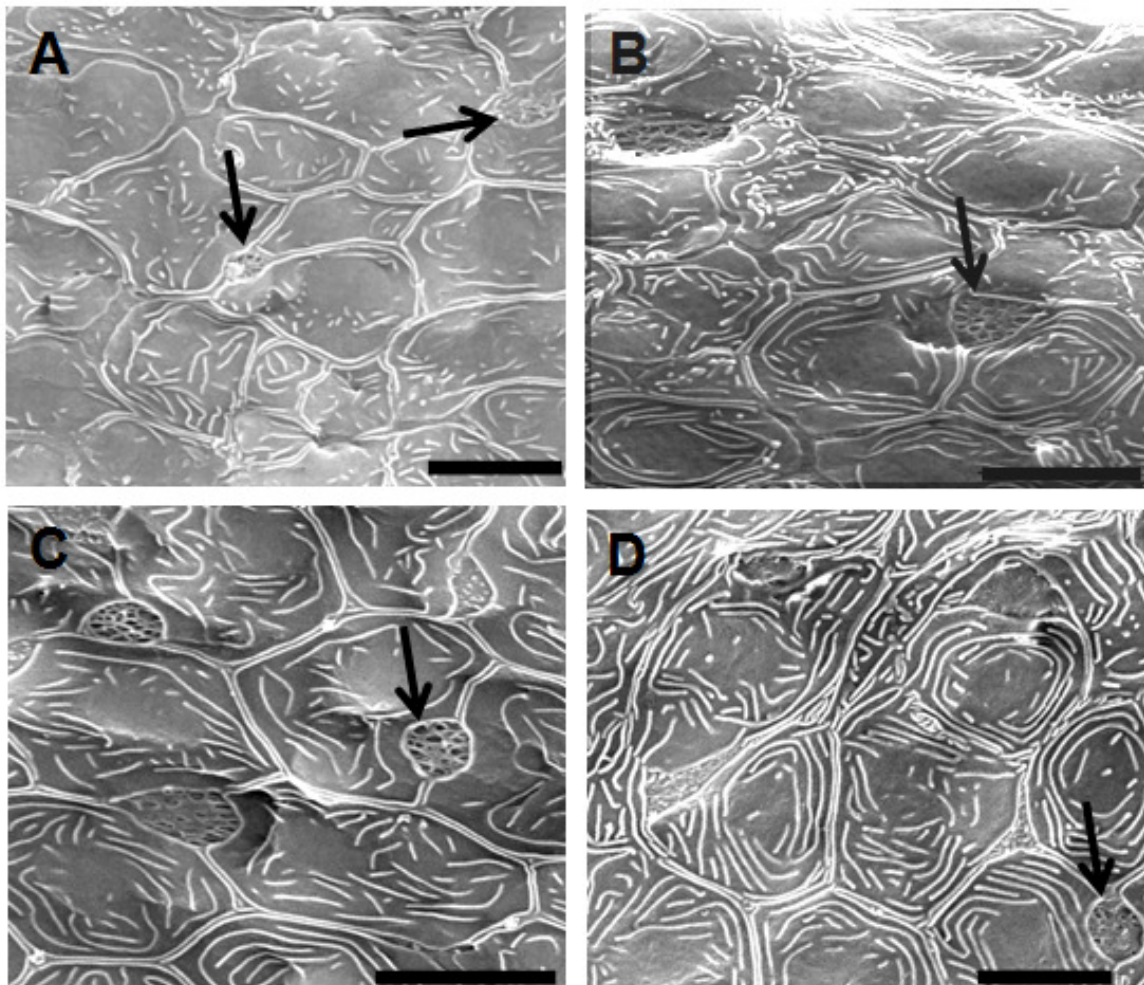


Figura 18. Eletromicrografias de varredura da superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) grupo controle - 48 horas e (B) grupo exposto a 25 µg.L⁻¹ de atrazina por 48 horas. (C) grupo exposto a 10 µg.L⁻¹ expostos por 14 dias e (D) grupo exposto a 25 µg.L⁻¹ por 14 dias. Setas pretas indicam a superfície apical das células-cloreto. Escalas = 10 µm.

As CCs estão principalmente distribuídas pelo epitélio do filamento branquial, embora essas células possam ser encontradas no epitélio lamelar. Nos grupos controle (48 h e 14 dias), as CCs estavam presentes no filamento e nas lamelas

(Figura 19 A e 19 C, respectivamente). O número de CC diminuiu significativamente apenas no filamento do grupo de peixes expostos à $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina durante 48 horas (Figura 19 B e 20 A). No grupo de animais expostos por 14 dias, a diminuição no número de CCs do filamento e lamela não foi estatisticamente significativa (Figura 20 B).

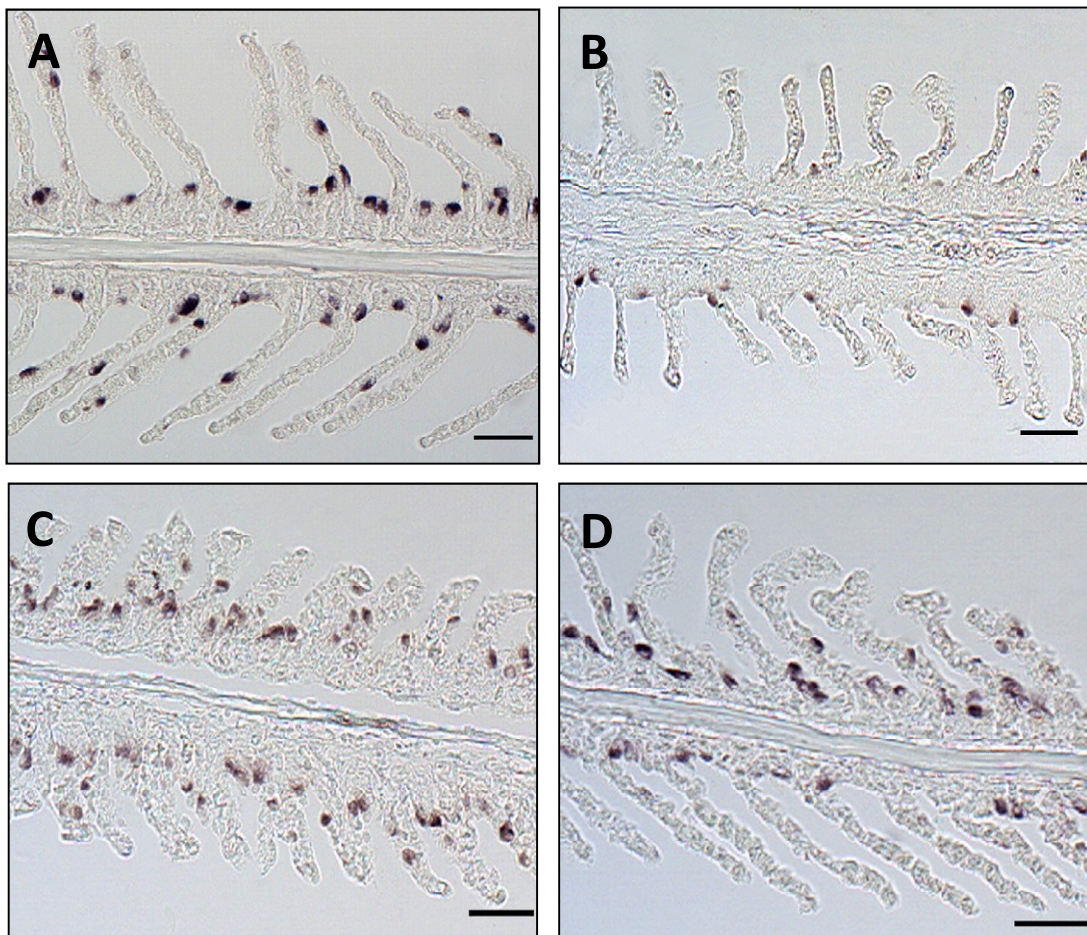


Figura 19. Imunohistoquímica contra Na^+/K^+ -ATPase das células-cloreto branquiais de *P. lineatus*. (A) Grupo controle 48 horas e (B) Após exposição à concentração de $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ em 48 horas. (C) Grupo controle 14 dias (D) $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 14 dias. Barra de escala = $40 \mu\text{m}$.

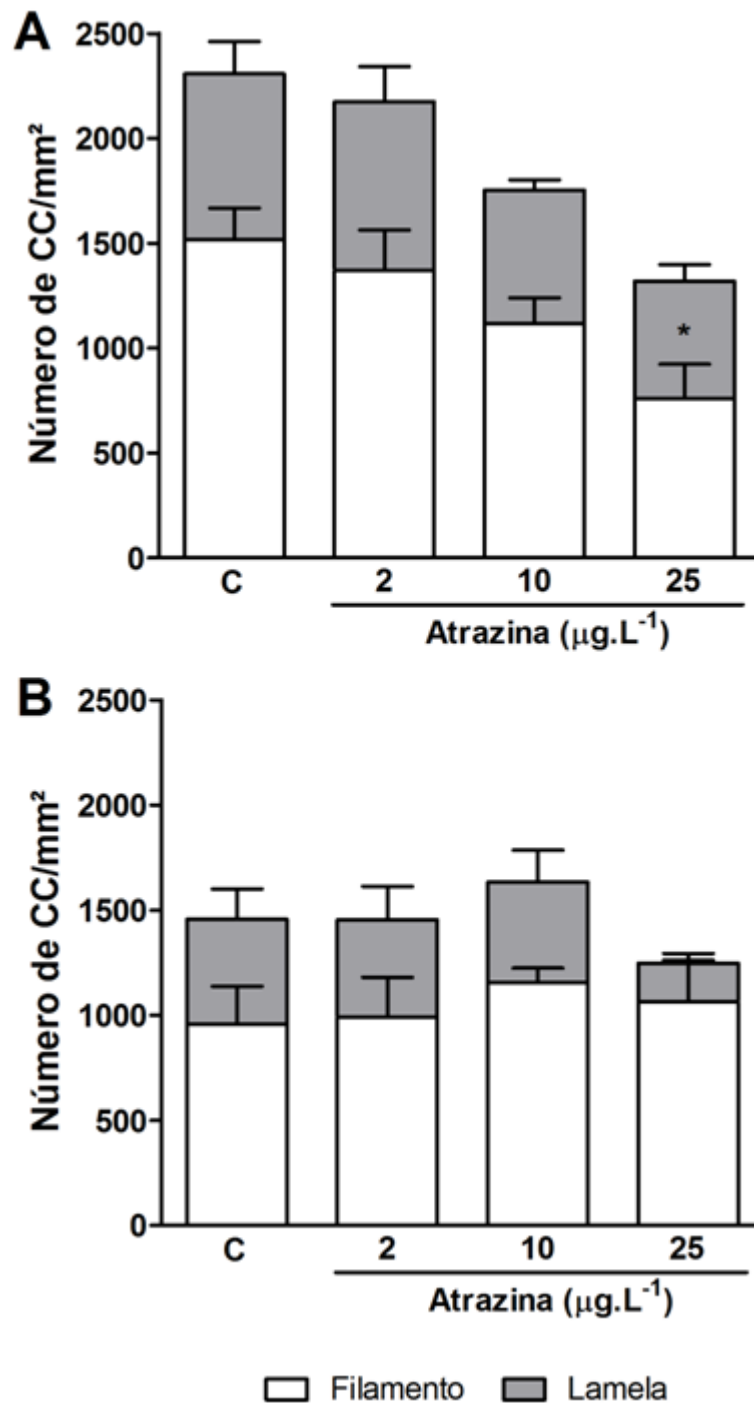


Figura 20. Valores médios (média \pm erro) de células-cloreto imunomarcadas no filamento e lamela de *P. lineatus* exposto á atrazina. (A) Número de CC/mm² no filamento e lamelas de peixes expostos por 48 horas. (B) Número de CC no filamento e na lamela do grupo exposto durante 14 dias. * indica diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle.

A atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase, nas brânquias de *P. lineatus*, não foi alterada significativamente em nenhuma das concentrações de atrazina em relação aos respectivos controles (Figura 21), independente do tempo de exposição.

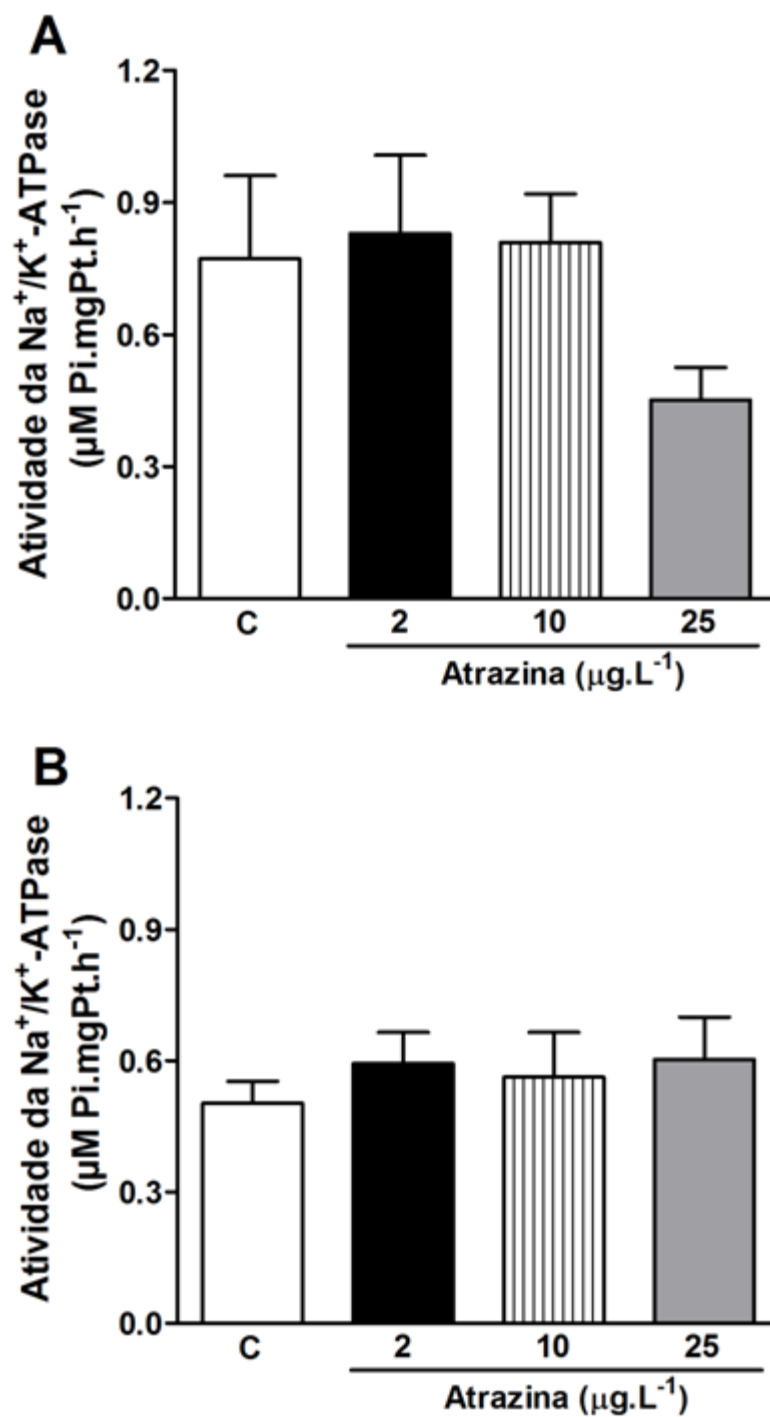


Figura 21. Atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase de *P. lineatus* expostos á atrazina durante 48 horas (A) e 14 dias (B). Valores médios (média \pm erro).

No período de 48 h ou 14 d, o número de CC expostas (densidade das CCs) na superfície do epitélio do filamento aumentou significativamente no grupo exposto à concentração de 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (Figura 22 A e B, respectivamente), entretanto, no mesmo período, a AFCC foi significativamente mais alta nos animais expostos à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina ($P < 0,05$) (Figura 22 C e D, respectivamente).

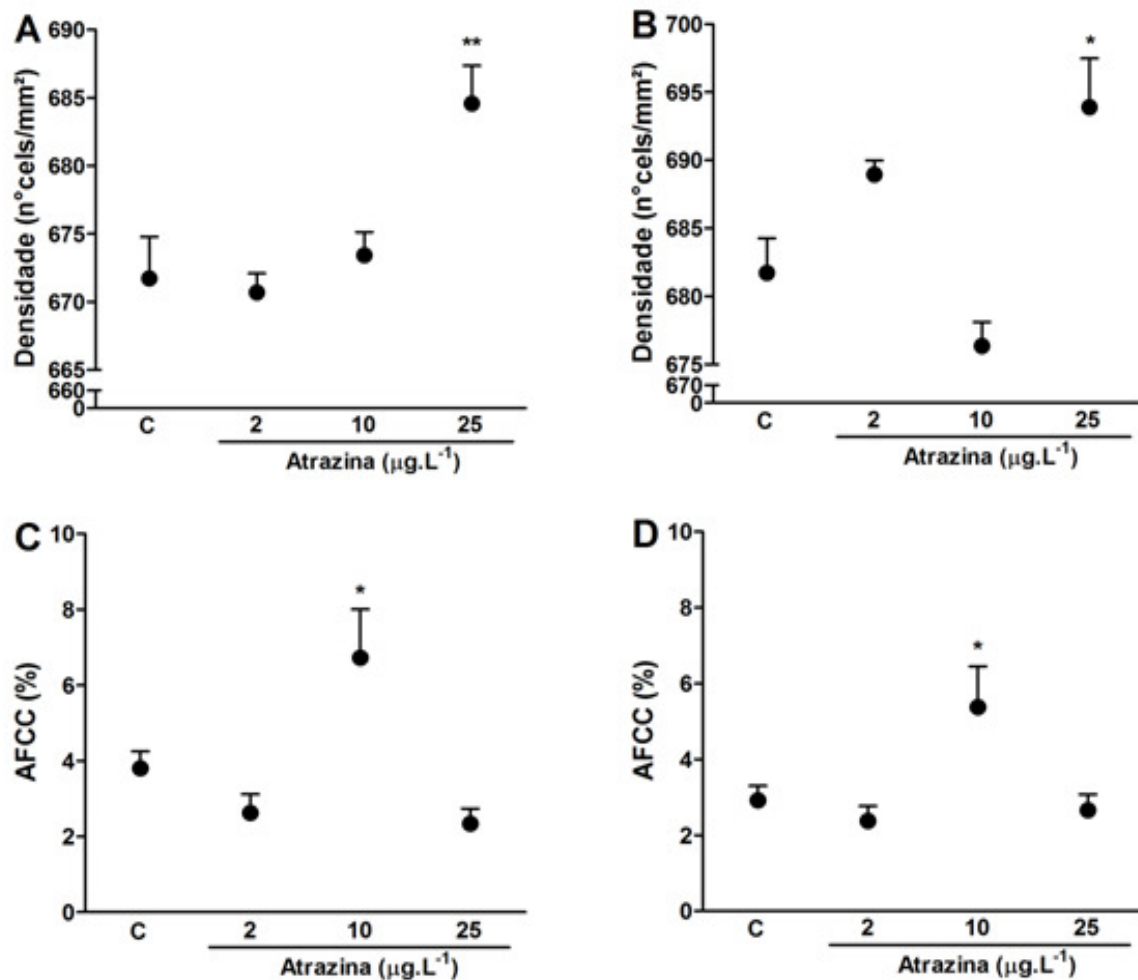


Figura 22. Morfometria da superfície das células-cloreto (CC) de *P. lineatus*. (A) Densidade de CC em animais expostos a 48 horas e (B) Densidade de CC em animais expostos por 14 dias. (C) Área fracional de células-cloreto (AFCC) do grupo exposto por 48 horas e (D) AFCC da exposição por 14 dias. * Indica diferença estatística com $P < 0,05$ e ** indica diferença estatística com $P < 0,01$ em relação ao controle.

4.4 Células Mucosas

Nos filamentos branquiais de *P. lineatus* foram identificadas 4 tipos de células mucosas contendo glicoproteínas com diferentes propriedades: células mucosas tipo 1 (PAS positiva), contendo mucosubstâncias neutras e ácidos siálicos; tipo 2 (AB pH 2,5 positiva), contendo mucinas sulfatadas com grupo carboxil; células mucosas tipo 3 (AB pH 1,0 positiva), contendo mucinas sulfatadas ácidas com um éster sulfatado e CM tipo 4 (PAS + AB positiva), contendo todas as mucosubstâncias acima (Figura 23).

A exposição da atrazina não causou alteração na frequência de CM tipo 1 (Figura 24). As CM tipo 2 aumentaram em animais exposto por 48 h à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina e não causou alteração quando expostos por 14 dias. Em relação ao controle, as CM tipo 3 diminuíram quando os peixes foram expostos em 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em 48 h, porém, quando os animais foram expostos por 14 dias, foi observado uma diminuição das mesmas nas concentrações de 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 25). As CM tipo 4 aumentaram apenas nos animais expostos por 48 horas na concentração de 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (Figura 26).

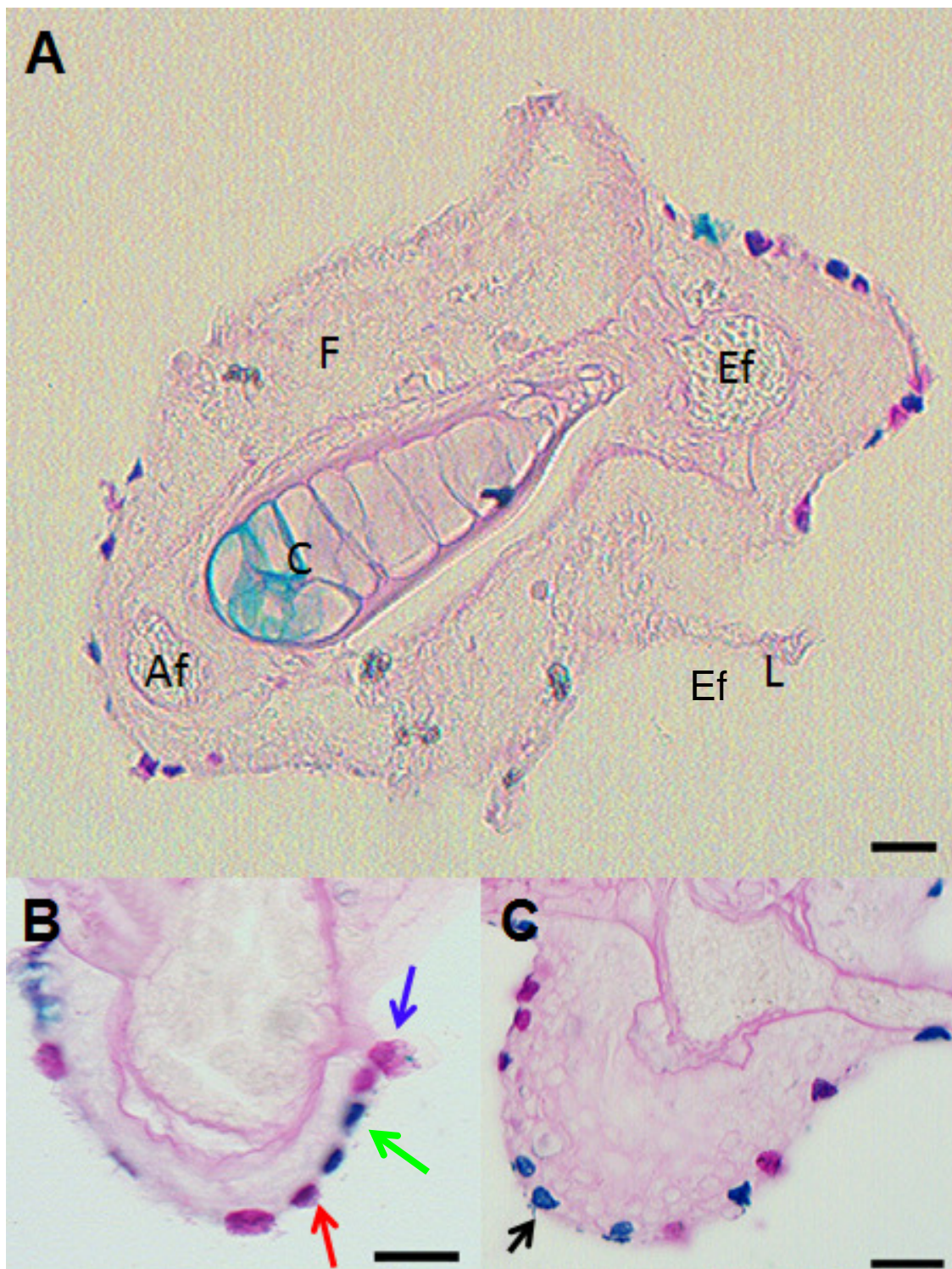


Figura 23. Histoquímica de células mucosas (CM) nas brânquias de *Prochilodus lineatus*. (A) Corte transversal do filamento branquial mostrando a localização das células mucosas. (B) CM tipo 1 (seta azul); CM tipo 2 (seta verde) e CM tipo 4 (seta vermelha); (C) CM tipo 3 (seta preta). Abreviações: C= cartilagem; F= filamento; L= lamela; Af= artéria aferente; Ef= artéria eferente. Barra de escala = 20 μ m.

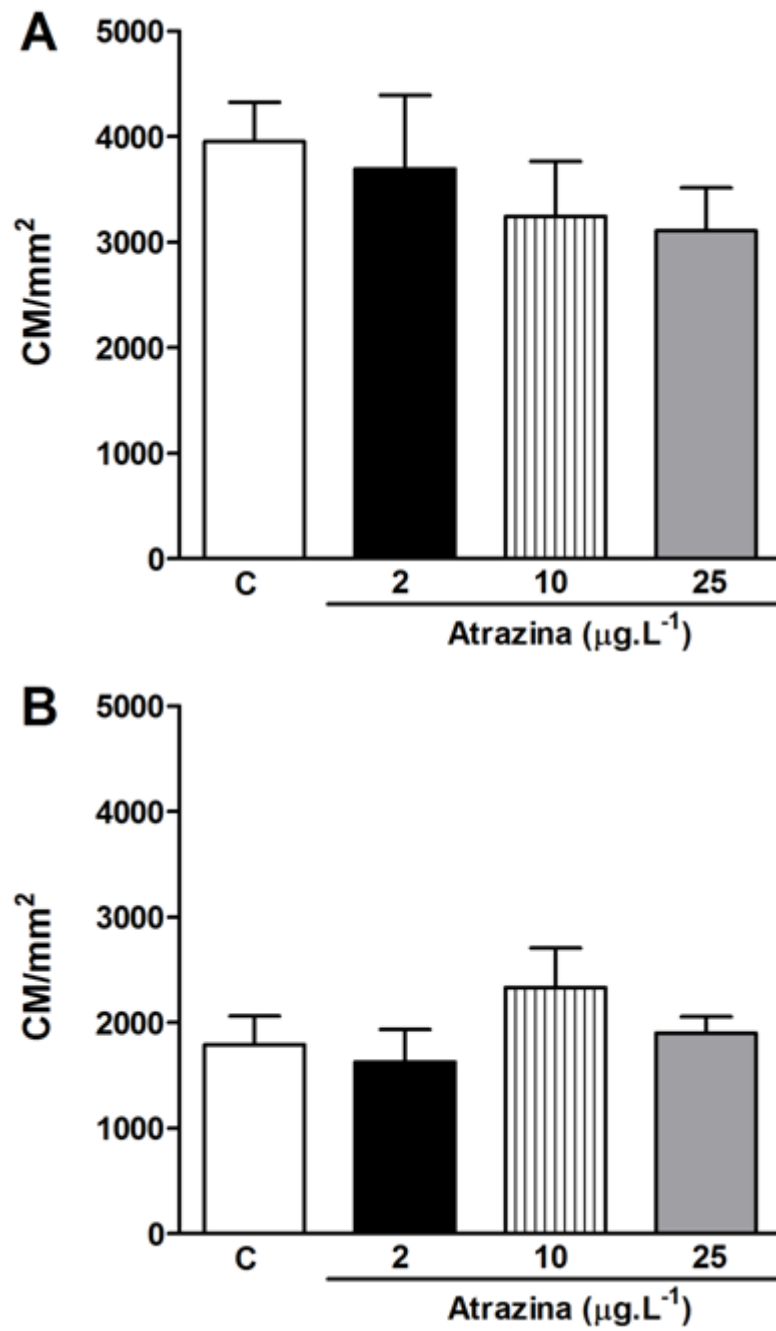


Figura 24. Células mucosas (CM) tipo 1 no filamento de *P. lineatus* controle e expostos à atrazina. (A) Grupo exposto por 48 horas e (B) Grupo exposto por 14 dias.

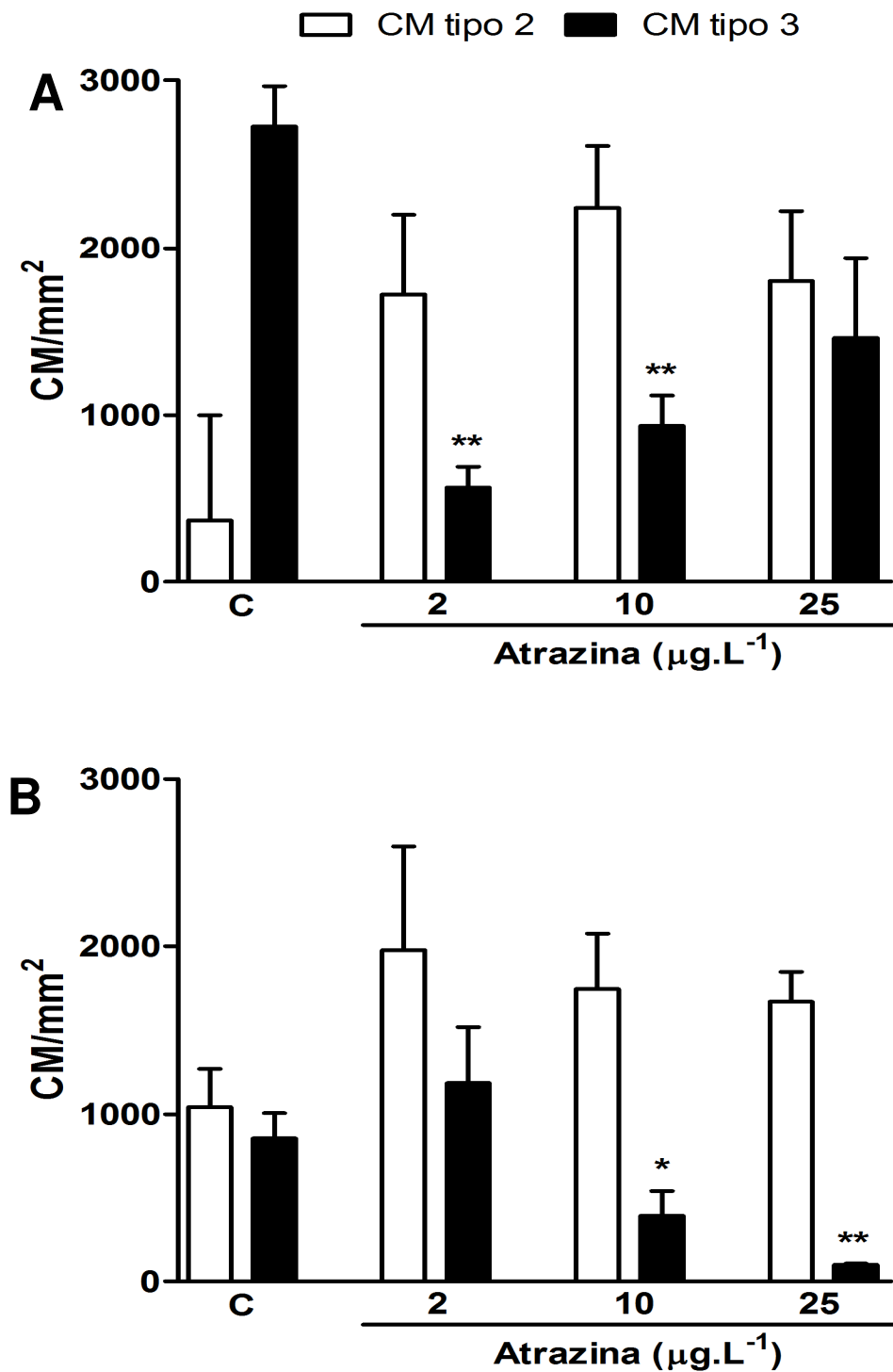


Figura 25. Células mucosas tipo 2 e tipo 3 no filamento de *P. lineatus* expostos à atrazina. (A) Grupo exposto por 48 horas e (B) Grupo exposto por 14 dias. * indica diferença estatística com intervalo de confiança de 95% em relação ao controle; ** $p > 0,01$.

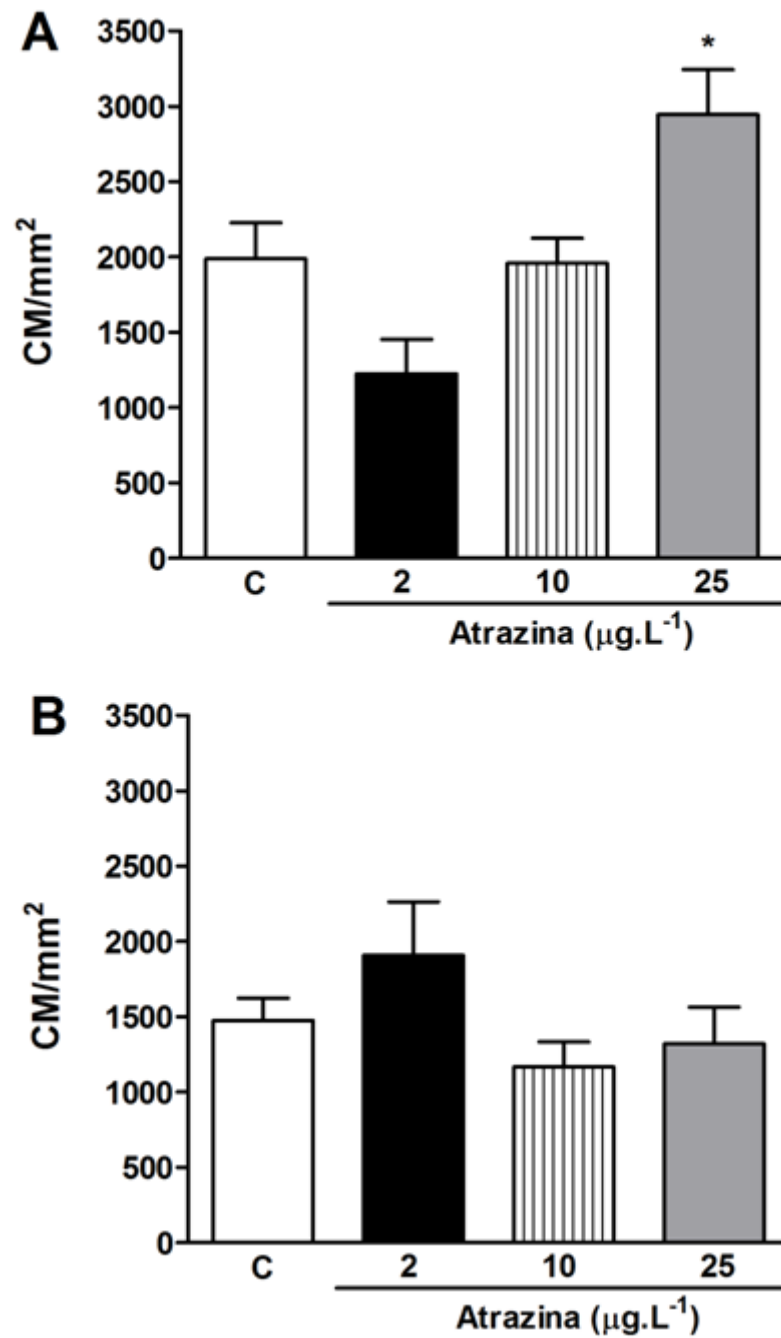


Figura 26. Células mucosas tipo 4 no filamento de *P. lineatus* expostos à atrazina. (A) Grupo exposto por 48 horas e (B) Grupo exposto por 14 dias. * indica diferença estatística com intervalo de confiança de 95% em relação ao controle.

4.5 Análises Plasmática

Após exposição aguda (48 h) à atrazina, apenas o grupo de peixes expostos à 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou uma diminuição na osmolalidade plasmática em relação ao grupo controle no mesmo período, enquanto que após exposição crônica (14 dias), um aumento significativo ($P < 0,01$) na osmolalidade foi observado em animais expostos à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina, em relação ao grupo controle.

As concentrações do Na^+ e Cl^- aumentaram significativamente ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) em animais expostos a 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina após 14 dias em relação ao respectivo grupo controle. O íon potássio não apresentou alteração durante a exposição à atrazina, independente do período de exposição e das concentrações testadas (Tabela 5).

Tabela 5. Concentração dos íons e osmolaridade plasmática em *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de atrazina.

Exposição	Atrazina	Osmolalidade total (mOsmol.Kg ⁻¹)	Íons (mEq.L ⁻¹)		
			Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
48 horas	Controle	259,0 ± 5,6	139,3 ± 4,9	3,83 ± 0,13	94,8 ± 6,8
	2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	267,0 ± 8,2	146,0 ± 4,6	3,27 ± 0,13	89,3 ± 4,1
	10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	254,8 ± 4,7	139,8 ± 3,1	3,11 ± 0,07	99,3 ± 7,4
	25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	238,2 ± 3,8*	137,8 ± 9,4	3,98 ± 0,24	90,8 ± 8,5
14 dias	Controle	244,8 ± 2,1	129,2 ± 3,1	3,55 ± 0,24	84,6 ± 4,9
	2 $\mu\text{g.L}^{-1}$	248,2 ± 3,3	137,1 ± 2,2	3,68 ± 0,14	95,8 ± 6,6
	10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	257,7 ± 2,4**	140,4 ± 5,1	3,67 ± 0,17	99,9 ± 4,6
	25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	241,3 ± 3,1	154,2 ± 9,4*	3,56 ± 0,27	109,1 ± 4,4**

Valores expressos em média ± erro-padrão da média. (*) = diferença significativa ($P < 0,05$) e (**) = diferença significativa ($P < 0,01$) em relação ao controle.

5 DISCUSSÃO

O organismo tem dois principais mecanismos de eliminação de agentes químicos: excreção, podendo ser na sua forma original, ou biotransformação, levando à formação de compostos hidrofílicos, os quais são excretados mais facilmente que o composto original (Vermeulen, 1996; Van der Oost et al., 2003). Apesar do principal órgão de biotransformação de xenobióticos ser o fígado (Jimenez e Stegeman, 1990; Van der Oost et al., 2003), alguns autores destacam a importância de outros órgãos detoxificantes como os rins, intestino e brânquias (Jönsson et al., 2002).

Em áreas poluídas, a exposição de peixes aos xenobióticos pode resultar em alterações na atividade das enzimas antioxidantes (Gül et al., 2004), causadas pelo excesso de espécies reativas de oxigênio. A expressão dessas enzimas é um mecanismo de adaptação importante ao estresse induzido por poluentes (Livingstone, 2001; Zhang et al., 2004). A atrazina e outros herbicidas, como o paraquat, são conhecidos por induzir estresse oxidativo nos tecidos de mamíferos e peixes (Elia et al., 2002). Como outros organismos, os peixes podem combater os níveis elevados de ERO, por ativação do sistema de defesa como a SOD, CAT e GPx. No presente estudo, a exposição aguda à atrazina não provocou um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a atividade das enzimas antioxidantes nas brânquias de *P. lineatus*. Nas brânquias, a atrazina parece não ter ação deletéria muito acentuada. Estudo prévio (Elia et al., 2002) já havia mostrado que *Lepomis macrochirus* expostos (96 h) a altas concentrações de atrazina (3000 a 9000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) não apresentaram alteração na atividade da SOD em brânquias, assim como em outras enzimas envolvidas no mecanismo antioxidante. Dessa forma, algumas células são capazes de suportar, até certo ponto, alterações oxidativas sem que ocorra nenhum efeito deletério na função ou viabilidade celular (Jin et al., 2010). Na maioria das espécies, a ativação do sistema SOD-CAT, primeira linha de defesa antioxidante, indica uma rápida resposta dos mecanismos de defesa antioxidante e a exposição subcrônica à atrazina pode ativar o sistema SOD-CAT de forma dose não-dependente (John et al., 2001). Segundo Spanó (2004), a exposição de *Carassius auratus* a 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina não tem

efeito dose-dependente no crescimento gonadal em machos e fêmeas expostos por 21 dias. Esses resultados corroboram com os estudos de Jin et al. (2010), onde o aumento da SOD e CAT teve o máximo de indução na concentração de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em ovário de *Danio rerio* expostos por 14 dias, mas não em 100 ou 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Além disso, a atrazina não parece ser tecido-específica em relação às concentrações testadas nos diferentes estudos. O fígado, por exemplo, pode responder de forma dose-dependente à atrazina (Jin et al., 2010).

As enzimas glutathione S-transferase (GST) e a glutathione peroxidase (GPx) atuam em conjunto no processo oxidante, utilizando a glutathione reduzida (GSH) como co-fator (Monteiro et al., 2010). A GST atua na biotransformação dos xenobióticos. Em brânquias de *P. lineatus* expostos por 48 h, não houve alteração da atividade da GST (presente estudo), entretanto, no fígado, nas mesmas condições experimentais desse trabalho, a atividade da GST diminuiu significativamente, indicando uma inativação hepática dessa enzima (Santos, 2010). Por sua vez, a atividade da GST nas brânquias de *P. lineatus* aumentou de forma não-dependente das concentrações testadas (2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) após exposição crônica (14 dias) a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A exposição a altas concentrações de atrazina (9000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) durante 96 h induziu um aumento da atividade da GST no fígado de *Lepomis macrochirus* (Elia et al., 2002) e evidencia uma complexa resposta, de forma que a toxicidade da atrazina em concentrações dentro de uma faixa (por exemplo, 1 a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$) oscilam pelo envolvimento de outros mecanismos de defesa, que poderia envolver as enzimas de biotransformação de fase I, como a CYP1A (citocromo P450). A exposição a concentrações de atrazina acima de 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ levou ao um aumento da atividade da GST em brânquias de *Lepomis macrochirus* e em ovos de *Danio rerio*, sugerindo que a biotransformação da atrazina ocorre em diversos tecidos, independentemente da concentração e tempo de exposição, como evidenciado pelos trabalhos de Wiegand et al. (2001) e Elia e colaboradores (2002).

O conteúdo de GSH é importante para a eficiência dos mecanismos antioxidantes e de detoxificação. Além disso, a estrutura química da atrazina possibilita a conjugação direta com a GSH (Figura 27) e é uma possibilidade de detoxificação a partir de caminhos como a N-desalquilação e hidrolização (Shimabukuoro, 1970; Lamoureux e Rusness, 1989; Wiegand et al., 2001)

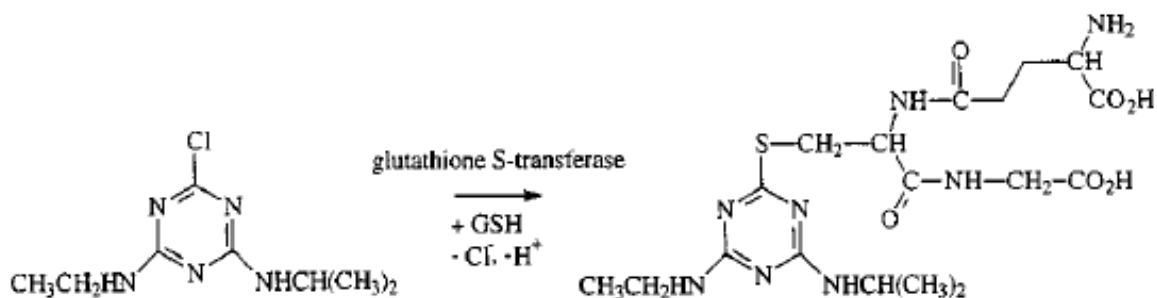


Figura 27. Conjugação da atrazina com a GSH, catalisada pela GST como uma via de detoxicação inicial do herbicida (Wiegand et al., 2001).

Nas brânquias de *P. lineatus*, a inalteração da concentração de GSH pode ser devido a uma rápida transferência do herbicida absorvido para o sangue e fígado, principal órgão de detoxificação, onde pode ocorrer a biotransformação do herbicida. Corroborando com essa hipótese, há diminuição de GSH no fígado de *P. lineatus* expostos a 2 e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 48 horas (Santos, 2010) e essa diminuição de GSH poder ter ocorrido em razão do aumento na utilização da GSH, que estaria sendo convertida à forma oxidada (GSSG) ou ineficiência da sua regeneração pela glutathione redutase (GR).

Da mesma forma, a GPx, que está intimamente relacionada ao conteúdo de GSH, não foi alterada nas brânquias de *P. lineatus* em ambos os períodos de exposição. Resposta semelhante foi observada nas brânquias de *L. macrochirus*, mas não em fígado, no qual houve diminuição da GPx (Elia et al. (2002), também no fígado de *P. lineatus* ocorreu uma diminuição da atividade da GPx (Santos, 2010). Alguns estudos mostram que a atividade da GPx pode aumentar (Almeida et al., 2002; Zhang et al., 2004) ou diminuir (Fátima et al., 2000; Oruc et al., 2004), a fim de neutralizar os impactos dos peróxidos. Considerando os dados do presente estudo e aqueles obtidos por Santos (2010) no fígado de *P. lineatus*, há evidências de que o fígado pode ser o principal órgão para a biotransformação desse herbicida.

Um dos danos oxidativos envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, que se mostrou aumentada nas brânquias de *P. lineatus* expostos a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ por 14

dias, sugerindo que nesse grupo as defesas antioxidantes (SOD, CAT e GST), apesar de estarem aumentadas, não foram eficientes em evitar que o dano ocorresse.

As histopatologias branquiais são alterações morfológicas em consequência de alterações bioquímicas e fisiológicas nas células e tecidos branquiais causados por fatores ambientais, como patógenos e poluentes, que podem modificar a função normal do órgão (Couch e Fournie, 1993). A maioria das lesões branquiais que ocorrem em exposições subletais afeta o epitélio da lamela secundária, uma vez que esse tecido é extremamente sensível, dinâmico e metabolicamente ativo (Hinton et.al., 1992). Alguns poluentes têm efeito direto sobre o tecido branquial, porém a maioria das lesões aparece como resultado de mecanismos de defesa ou mecanismos compensatórios, que podem ser locais ou mediados pelo eixo hipotálamo-hipófise-células interrenais e pelo sistema nervoso autônomo (Wendelaar Bonga, 1997).

No presente estudo, os grupos expostos a concentrações testadas de atrazina apresentaram hipertrofia e ruptura do epitélio lamelar. Hipertrofia do epitélio lamelar, assim como proliferação de células-cloreto ou mucosas, são exemplos de mecanismos de defesas contra o agente tóxico, impedindo que o agente entre no organismo. Entretanto, esses mecanismos aumentam a distância água-sangue e pode dificultar a efetividade das trocas gasosas (Mallat, 1985; Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994; Fernandes e Mazon, 2003). Hipertrofia e ruptura no epitélio branquial também foram observadas por Jayachandran e Pugazhendy (2009) em brânquias de *Labeo rohita* expostas a $180 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 120 h. As rupturas epiteliais são lesões que refletem o efeito direto de poluentes (Temminck et al., 1983), ocorrendo em condições de maior toxicidade (Abel et al., 1976). O aumento do fluxo sanguíneo das brânquias, em consequência do aumento da demanda metabólica para a detoxificação do xenobiótico, pode promover lesões nas células pilares (CP), que controlam o fluxo sanguíneo nas lamelas, influenciando na trocas gasosas e na permeabilidade do epitélio e, conseqüentemente, a osmorregulação (Randall, 1982; Wilson e Laurent, 2002). Ruptura ou dilatação do canal marginal e flange das células pilares promovem alterações secundárias do estágio I e II, como congestão sanguínea e aneurisma lamelar (Rosety-Rodriguez, 2002).

Outro mecanismo de defesa é a hiperplasia celular nas lamelas e filamento. Essa proliferação tende diminuir os espaços interlamelares, reduzindo o contato do epitélio branquial com o agente estressor. Em condições mais severas, a hiperplasia pode levar à fusão parcial ou total da lamela, pontualmente ou de uma forma geral, reduzindo a superfície respiratória, devido ao desaparecimento das lamelas (Rajbanshi & Gupta, 1988). Embora pouco freqüentes, neste estudo, a fusão lamelar nas brânquias de *P. lineatus* ocorreu nos dois períodos de exposição, nas concentrações mais altas. Em relação à atrazina, tanto em 96 h como em 14 dias, Neskovic et al. (1993) encontraram fusão das lamelas nas brânquias de carpas em animais expostos a concentrações de atrazina entre 1500 a 6000 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Observações semelhantes foram descritas por Jayachandran e Pugazhendy (2009) em brânquias de *Labeo rohita*. De acordo com Neskovic et al. (1993), alterações nas brânquias de peixes expostos à atrazina são mais freqüentes do que em fígado e rins e parecem ser dose-dependentes. As alterações estruturais encontradas no presente estudo não são específicas para um tipo de toxicante. Tais alterações são observadas em peixes expostos a diversos tipos de contaminantes (Fanta et al., 2003; Martinez et al., 2004; Figueiredo-Fernandes et al., 2007; Simonato et al., 2008; Camargo et al., 2009) e parece ser um mecanismo protetor contra a entrada do contaminantes, mas que pode resultar em redução da superfície respiratória e um aumento da distância de difusão poluente-sangue (Black e McCarthy, 1990). De uma forma geral, as alterações encontradas as brânquias de *P. lineatus* nas concentrações testadas são classificadas como moderadas e não interferem nas funções das brânquias.

A superfície apical da membrana das células do epitélio branquial em contato direto com o meio pode ser alterada, devido às características do ambiente. A superfície apical das CC de *P. lineatus* é caracterizada por microvilosidade e algumas apresentam superfície apical de forma convexa e com aparência de 'esponja'. Após exposição à atrazina aumentou o número de CC com essa microdobras foi mais evidente. Esse tipo é característico das CCs de outras espécies, como *Ictalurus nebulosus* e *Oncorhynchus mykiss* (Perry, 1997). Em tilápias, *Oreochromis mossambicus*, a membrana apical está localizada abaixo das células pavimentosas (CPVs), formando uma 'cripta', que é um formato característico presente em teleósteos marinhos (Perry, 1997). Existem diferentes

tipos de arquitetura apical das CC e todas elas são distintas das demais células presente no epitélio branquial, como as células pavimentosas e células mucosas (CM).

As CPVs são normalmente grandes e com formato poligonal e podem apresentar em sua superfície microdobras ou microvilosidades e microdobras longas marcam os limites celulares (Laurent, 1984; Wilson e Laurent, 2002). A superfície da CPV pode ser alterada quando os animais estão expostos a algum tipo de agente estressor. *Oreochromis mossambicus* expostos ao cádmio mostra perda nas microdobras das CPVs (Wong e Wong, 2000). No presente estudo, as microdobras das CPVs próximas à região lamelar aumentaram nos animais expostos à atrazina, o que poderia ser uma resposta do animal para aumentar a superfície de contato com a água e/ou promover a retenção de muco que poderia funcionar como uma barreira de proteção contra a atrazina e auxiliar na regulação iônica. Hughes (1979) propôs diferentes funções para o aumento das microdobras em CPVs de trutas, *Salmo gairdneri*, como o aumento da superfície respiratória e produção de 'microturbulências' na região que faria a recepção do oxigênio, além da retenção de muco. Alterações morfológicas na superfície celular podem ser registradas após 1 hora de exposição a um determinado agente estressante (Machado e Fanta, 2003).

As águas continentais brasileiras são moles e pobres em íons, principalmente de Na^+ , Cl^- e Ca^{+2} (Fernandes e Perna-Martins, 2002). Em água dura e rica em íons, as células-cloreto estão restritas à região interlamelar do epitélio do filamento e na borda do filamento próximo à região basal das lamelas (Perry, 1997), sendo que o número de CC está intimamente relacionado com a concentração dos íons na água, de forma a manter a homeostase iônica (Perry, 1997; Fernandes e Perna-Martins, 2002). A presença de xenobióticos na água pode alterar a densidade das CCs e interferir na sua função. No presente estudo, o número de CC diminuiu nos filamentos branquiais dos peixes expostos a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ por 48 h. Alteração desse tipo ocorre em respostas compensatórias na troca iônica para manter ou restaurar o balanço hidroeletrólítico (Van der Heuvel et al., 2000; Dang et al., 2000).

Vários estudos relacionam o aumento ou a diminuição do Na^+ e Cl^- com o aumento ou diminuição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (Laurent e Hebibi, 1989; Bury et al., 1998). Muitos pesticidas são conhecidos por alterar a atividade das ATPases que são enzimas-chave do transporte ativo das membranas (Moore et al.,

2003). No presente estudo, apesar das alterações na osmolaridade e concentração de íons, a atividade da NKA não apresentou diferença em relação ao controle. Similarmente aos nossos resultados, Matsumoto e colaboradores (2010) mostraram que mesmo em concentrações mais elevadas de atrazina ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$), a atividade da NKA branquial de *Salmo salar* permaneceu inalterada. A NKA é responsável pelo transporte de íons sódio e potássio de forma a manter o equilíbrio iônico, mas também auxilia outros sistemas de transportes nas brânquias (Hwang e Lee, 2007). Estudos anteriores têm mostrado que a exposição à atrazina causa alterações nos níveis de eletrólitos no plasma e essas alterações são acompanhadas pela alteração da atividade específica da NKA (Waring e Moore, 2004; Nieves-Puigdoller et al., 2007). Outro fator limitante associado à atividade da NKA é o número de células-cloreto presente nas brânquias e a concentração de íons na água.

Apesar da diminuição no número de CCs em *P. lineatus*, a função na homeostase iônica foi parcialmente compensada pelo aumento na AFCC, de forma que a concentração de íons Na^+ e Cl^- plasmáticos foi mantida. O aumento da AFCC aumenta a superfície de contato do meio com a célula favorecendo a absorção de íons (Laurent e Hebibi, 1989; Greco, 1995). Perry et al. (1992) estabeleceram uma correlação positiva entre a área fracional das células-cloreto e a taxa de captação de Na^+ e Cl^- em quatro espécies diferentes de peixes de água doce. Portanto, a capacidade de transporte de íons está relacionada com a área fracional das células-cloreto em contato com o ambiente externo e não apenas com o número total de células, que incluem células em diferentes estágios do ciclo celular, incluindo células imaturas e em degeneração, as quais têm uma menor capacidade de transporte iônico (Fernandes e Perna-Martins, 2002). Em teleósteos, existe uma grande diversidade a respeito do número de CC e sua área exposta ao meio. Por exemplo, em Anguillidae (família das enguias) há poucas CC no epitélio enquanto que em salmonídeos as CC são abundantes (Perry et al., 1992; 1997). Em *P. lineatus*, as CC estavam presentes tanto nos filamentos, borda e em regiões interlamelares quanto nas lamelas, na ausência de atrazina. A presença de CC nas lamelas é característica da espécie, como já foi mostrado por Mazon et al., (2002) e Camargo et al. (2009). A localização e densidade desse tipo celular, na maioria dos teleósteos, dependem da quantidade de íons presentes na água e eficiência iônica e osmoregulatória da espécie (Moron et al., 2003).

A densidade das células mucosas, assim como a produção de muco, varia entre as diferentes espécies e pode variar, dependendo das condições ambientais (Laurent, 1984; Moron et al., 2009). A exposição a agentes poluidores, em geral, promove alteração no número e tipo de muco dessas células. A maioria das glicoproteínas (ácidas ou neutras) possui cargas elétricas na superfície da molécula, a qual atrai íons e assim favorecem a absorção desses íons pelas células-cloreto e tem uma influencia indireta na osmorregulação (Powell et al., 1994; Varsamos et al., 2005). A natureza poliônica do muco ajuda a reter os cátions próximos ao epitélio branquial, resultando em um gradiente iônico na camada mucosa (Shepard, 1989).

Mucosubstâncias neutras, como hexoses e ácidos siálicos, têm baixa viscosidade e lubrificam o epitélio branquial contra injúrias físicas (Sibbing e Uribe, 1985), enquanto que mucinas ácidas e sulfatadas têm alta viscosidade, favorecendo a retenção de partículas em suspensão (Sibbing e Uribe, 1985). Em *P. lineatus*, o número de CM tipo 1 que produzem mucosubstâncias neutras não foi alterada, mantendo a lubrificação normal do epitélio. Entretanto, as alterações observadas no número de CM tipo 2 e 3 evidenciam um efeito da exposição à atrazina, particularmente nas células que produzem substâncias sulfatadas ácidas, contendo um grupamento éster sulfatado. A redução no número dessas células pode estar associada à hiposecreção de mucinas viscosas, com consequente diminuição da retenção de partículas junto à superfície branquial. O muco é importante para as defesas naturais contra parasitas e micro-organismos patogênicos (Fletcher, 1978), por outro lado, pode indicar um processo patológico em resposta às condições ambientais (Wendellar Bonga e Lock, 1992; Ortiz et al., 1999; Sarasquete et al., 2001). O muco liberado ou a coagulação do mesmo na superfície branquial pode dificultar a transferência de oxigênio da água para o sangue, como observado por Grobler e colaboradores (1989) em *Tilapia sparrmanii* expostas a 8,1 mg.L⁻¹ de atrazina, cuja hipersecreção do muco diminuiu a obtenção de oxigênio.

Muitos agentes estressores podem causar distúrbios hidrominerais em peixes (Barton et al, 1991). Em teleósteos de água doce, o fluido corporal é hiperosmótico em relação ao meio, dessa forma, esses animais precisam evitar o ganho de água e a perda de íons por difusão. Os contaminantes podem interferir com esse balanço osmótico por alteração do tecido branquial e/ou fluxo através das lamelas (Heath, 1995). Como as brânquias são os principais órgãos osmorregulatórios dos peixes,

as alterações no epitélio branquial podem resultar em aumento da perda de íons e ganho osmótico de água, alterando a concentração iônica e osmolaridade plasmática. Vários estudos mostraram que a atrazina pode também afetar a capacidade osmorregulatória em peixes (Hanke et al., 1983; Prasad e Ready, 1994; Graymore et al., 2001; Silvestre et al., 2002), por exemplo, em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), expostos a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina por 96 h, houve uma diminuição nas concentrações de Na^+ e Cl^- plasmático (Moron et al., 2006). A diminuição da osmolaridade após exposição aguda a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina (48 h) e o seu aumento após exposição crônica (14 dias) a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ que ocorreram em *P. lineatus* sem alterações nos íons plasmáticos, sugerem uma possível perda ou ganho de algum osmólito, sem interferência na concentração iônica. Por sua vez, o aumento das concentrações plasmáticas de Na^+ e Cl^- nos animais expostos à atrazina a $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ (14 dias) não causou desequilíbrio eletrolítico, uma vez que a razão Na^+/Cl^- permaneceu similar em todos os grupos. Os processos que tendem a aumentar ou diminuir os íons sódio tendem a aumentar ou diminuir os íons cloreto e quando isso não ocorre, há o desequilíbrio eletrolítico.

Em geral, os estressores afetam o balanço hidromineral em peixes diretamente ou indiretamente, devido ao aumento de catecolaminas circulantes, aumentando, assim, a permeabilidade das brânquias aos íons e à água (McDonald e Milligan, 1992; Wendelaar Bonga, 1997). Alterações na osmolaridade com modificações nas concentrações de íons plasmáticos foram relatadas em salmões (*Salmo solar*), transferidos para água doce, expostos a $6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ou mais de atrazina por 7 dias (Waring e Moore, 2004) e ausência de alteração no equilíbrio eletrolítico também foi relatada em animais expostos a concentrações de 1, 10 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina em experimentos realizados por Matsumoto e colaboradores (2010). As alterações na osmolaridade podem estar associadas a desvios de água entre plasma e líquido intersticial, além da presença ou não de metabólitos no sangue. Outro fator que pode alterar a osmolaridade e concentrações de íons no plasma é alteração no tecido renal, uma vez que a atrazina pode ser metabolizada nos rins e excretada pelas brânquias Braunbeck (1992). A atrazina induz lesões renais em concentrações de 10 a $160 \mu\text{g.L}^{-1}$ durante uma exposição crônica (Braunbeck, 1992) e essas lesões podem aumentar a excreção renal de Na^+ , Cl^- e K^+ , além de proteínas (Santa

Maria, 1986; Fischer-Scherl, 1991), levando a alterações na homeostase iônica do animal.

Os resultados obtidos mostram claramente que as concentrações testadas do herbicida atrazina promove alterações no funcionamento normal das brânquias de *P. lineatus*, desde o nível bioquímico até o tecidual. As alterações no epitélio branquial não resultaram em um desequilíbrio eletrolítico e todas as respostas celulares promovidas pela exposição sugerem um ajuste bioquímico e morfológico para a manutenção da homeostase.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho, a exposição de *P. lineatus* às concentrações subletais (2, 10 ou 25 µg.L⁻¹) de atrazina por 48 horas ou 14 dias avaliadas em brânquias permitiu as seguintes conclusões:

1. A atrazina, mesmo em baixas concentrações, pode alterar o funcionamento normal das brânquias de *P. lineatus* como mostrado pela exposição subcrônica.
2. Em 14 dias de exposição à atrazina, há dano oxidativo nas brânquias de *P. lineatus*, indicado pelo aumento da LPO.
3. A atrazina, nas concentrações testadas, não causou um desequilíbrio iônico nem alteração da atividade da NKA, apesar das alterações nas concentrações dos íons sódio e cloreto.
4. Apesar da redução do número de CCs no filamento branquial durante a exposição aguda, o aumento da área apical das CCs na superfície branquial evidencia um ajuste morfo-funcional dessas células, possivelmente para manutenção da homeostasia iônica.
5. O aumento de microdobras em células pavimentosas próximas à região lamelar nos grupos expostos à atrazina promove um aumento da superfície celular e pode estar associado à retenção de muco.
6. As alterações no número de células mucosas estão associadas à hiposecreção de mucinas viscosas, diminuindo a retenção de partículas junto ao epitélio branquial.

7. A exposição crônica à atrazina ($25 \mu\text{g.L}^{-1}$) causa alterações histopatológicas moderadas nas brânquias de *P. lineatus*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL P.D. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L). J. Fish Biol., 9, 441-446, 1976.

ABEL, P.D. Water Pollution. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1989.

ADAMS, S.M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Am. Fish. Sc., 3, 104-112, 2002.

AGRAHARI, S.; GOPAL, K. Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. Pest. Biochem. Physiol., 92, 57-60, 2008.

AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA M.; CHAND, H.S.; JAIN S.K.; ATHAR M.; RAISUDDIN S. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. Biochim. Biophys. Acta., 1519, 37-48, 2000.

ALAM, M.; FRANKEL, T. Gill ATPase of silver perch, *Bidyanus bidyanus*, and golden perch, *Macquaria ambigua*: effects of environmental salt and ammonia. Aquaculture, 251, 118-113, 2006.

ALAZEMI, B.M.; LEWIS, J.N.; ANDREWS, E.B. Gill damage in the freshwater fish, *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selective pollutants: an ultrastructural study. Environ. Technol., 17, 225-35, 1996.

ALMEIDA, J.A.; DINIZ, Y.S.; MARQUES, S.F.G.; FAINE, L.A.; RIBAS, B.O.; BURNEIKO, R.C.; NOVELLE, E.L.B. The use of oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. Environ. Int., 27, 673-679, 2002.

ALMEIDA, J.S.; MELETTI, P.C.; MARTINEZ, C.B.R. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 140, 356–363, 2005.

AMORIM, L.C.A. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição Ocupacional a Substâncias Químicas. *Rev. Brás. Med. Trab. Belo Horizonte*, 1, 124-132, 2003.

ANVISA. Índice Monográfico da Atrazina. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b5b33800405882b5ae6dff330f10004b/a14.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 11/01/2011.

ARCHANGELO, E.R. Sorção, desorção e potencial de lixiviação de atrazine e dimethenamide em solos brasileiros. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa, 63f, 2003.

BAINY, A.C.D. How to evaluate the safety chemical substances in aquatic environments. *Ciência e Cultura*, 45, 10-11, 1993.

BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Rev. Fish Dis.*, 1, 3-26, 1991.

BATTAGLIN, W.A.; FURLONG, E.T.; BURKHARDT, M.R.; AND PETER, C.J. Occurrence of sulfonyleurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Sci. Tot. Environ.*, 248, 123–133, 2000.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Dis.*, 22, 25-34, 1999.

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 6, 882-890, 1963.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods. Grune & Stratton, New York, 1975.

BIANCHINI, A.P.; CARVALHO DE CASTILHO, P. Effect of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na⁺, K⁺-ATPase of the Estuarine Crab *Chasmagnathus granulata* Dana, 1951 (Decapoda-Grapsidae), Bull. Environ. Contam. Toxicol., 62, 63–69, 1999.

BINDON, S.D.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Implications for gas transfer. Can. J. Zool., 72, 1395-1412, 1994a.

BINDON, S.D.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. The effect of branchial chloride cell proliferation on gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, J. Exp. Biol., 197, 47-63, 1994b.

BLACK, M.C.; MCCARTHY, J.F. Effects of sublethal exposure to chlorine on the uptake of polychlorinated biphenyl congeners by rainbow trout. *salmo gairdneri* (richardson). Aquat. Toxicol., 17, 275-290, 1990.

BLANCO, G.; MERCER, R.W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. Am. J. Physiol., 275, 633–650, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254, 1976.

BRAUNBECK, T.; BURKHARDT-HOLM, P.; GÖRGE, G.; NAGEL, R.; NEGELE, R.D.; STORCH, V. Regenbogenforelle und zebrabärbling, xwei modelle für verlängerte toxiätstest: relative empfindlichkeit. Art- und organspezifität in der cytopathologischen reaction von leber and darm auf atrazin. Schr. Reihe Verein Wasser-. Boden-, Lufthygiene., 89, 109-145, 1992.

BRODEUR, J.C.; SVARTZ, G.; PEREZ-COLL, C.S.; MARINO, D.J.G.; HERKOVITS, J. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: Non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquat. Toxicol.*, 91, 161-170, 2009.

BURY, N.R.; LI, J.; LOCK, R.A. .; WENDELAAR BONGA, S.E. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquat. Toxicol.*, 40, 193-202, 1998

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ test in an urban stream in southern Brazil. *Environ.Toxicol. Pharmacol.*, 21, 61-69, 2006.

CAMARGO, M.M.P.; MARTINEZ, C.B.R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.*, 5, 327-336, 2007.

CAMARGO, M.M.P.; FERNANDES, M.N.; MARTINEZ, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat.Toxicol.*, 94, 40–46, 2009.

CASTRO, R.M.C. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Tese (doutorado). Universidade de são Paulo, 1990.

CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe,Argentina). *Environ. Pollut.*, 157, 3025–3033, 2009.

CERQUEIRA, C.C.C.; FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52, 83–91, 2002.

CHAPADENSE, P.F.G.; CASTRO, F.J.; ALMEIDA, J.A.; MORON, S.E. Toxicidade do herbicida atrazina em *Colossoma macropomum*. Re, Bras. Saúde Prod. An., 10, n.2, 398-405, 2009.

CHAPMAN, R.N.; STRANGER, J.W. Horticultural pesticide residues in water: a review of potential for water contamination by pesticides used in the vegetable industry in Victoria. Melbourne, Australia: Department of food and agriculture. p137. 1992.

CHOE, K.P.; EDWARDS, S.; MORRISON-SHETLAR, A.I.; TOOP, T.; CLAIBORNE, J.B. Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in mitochondrion-rich cells of the atlantic hagfish (*Myxine glutinosa*) gill, Comp. Biochem. Physiol., 124, 161–168, 1999.

CONAMA, 2005 – Conselho Nacional do Meio Ambiente/ Ministério do Meio Ambiente. Resolução Nº 357 de 17 de março de 2005. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2005>. Acesso em outubro, 2010.

CORREIA, F.V.; LANGENBACH, T. Dinâmica da distribuição e degradação da atrazina em argissolo vermelho-amarelo sob condições de clima tropical úmido. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa, 30, 2006.

COUCH, J.A.; FOURNIE, J.W. Advances in fisheries sciences. Pathobiology of Marine and Estuarine Organisms. CRC Press, Boca Raton, 1993.

DA SILVA, M.E.F.; SILVA, J.A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MEIRELLES, N.C. A new method to purify hepatic CYP1A of *Prochilodus scrofa*, a Brazilian freshwater fish. Comp. Biochem. Physiol., 138, 67–74, 2004.

CUMINGS, B. Na Pump. Publishing by. Pearson Education, Inc. Department of Biology. University of Miami. Florida. Disponível em: <http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/memb/c8x15NaK-pump.jpg>. Acesso em 11/01/2010.

DANG, Z.; LOCK, J.A.C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Na⁺/K⁺-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to cooper. J. Exp. Biol., 203, 379–387, 2000.

DAVIES, P.E.; COOK, L.S.J.; BARTON, J.L. Triazine herbicide contamination of Tasmanian streams: sources, concentrations and effects on biota. Aust. J. Mar. Freshwater res., 45, 209-26, 1994.

DEPARTAMENTO DE DEFESA E INSPEÇÃO VEGETAL. Compêndio de defensivos agrícolas. 6 ed. São Paulo: Andrei, 672p.1999.

DEVINE, M.D.; DUKE, S.O.; AND FEDTKE, C. Physiology of Herbicide Action. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1993.

DESZFULI, B.S.; GIARI, L.; KONECNY, R.; JAEGER, P.; MANERA, M. Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from Lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). Dis. Aquat. Org., 53, 257-262, 2003.

EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. J. Lab. Clin. Med., 118, 3-4, 1991.

EIRAS-STOFELLA, D.R.; CHARVET-ALMEIDA, P.; FANTA, E.; VIANNA, A.C.C. Surface Ultrastructure of the gills of the Mulletts *Mugil curema*, *M. liza* and *M.platanus* (Mugilidae, Pisces). J. Morphol, 247, 122-133, 2001.

EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. U. S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep., 85, 1-18, 1989.

ELIA, A. C.; WALLER, W. T.; NORTON, S. J. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. Bull. Environ. Cont. Toxicol., 68, 809-16, 2002.

EPSTEIN, F.H.; SILVA, P.; KORMANIK, G. Role of Na⁺/K⁺-ATPase in chloride cell function. *Am. J. Physiol.*, 238, R246–R250. 1980.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, M.; CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-base Regulation and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.*, 85, 97-177, 2005.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.*, 18, 872-879, 2002.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S., VIANA, A.C.C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxic. Environ. Saf.*, 54, 119–130, 2003.

FATIMA, M.; AHMAD I.I.; SAYEED, I.I.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S.. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissue. *Aquat. Toxicol.*, 49, 243-250, 2000.

FERNANDES, M.N.; PERNA-MARTINS, S.A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the Gill of the armored catfish, *Hypostomus tietensis* (Loricariidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 83, 321-328, 2002.

FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. Environmental Pollution and Fish Gill Morphology, In Val. A. L., Kapoor, B. G. (Eds.), *Fish Adaptations Science Publishers, Inc. Enfield, USA*, 203-231. 2003.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J.V.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. histopathological changes in liver and Gill epithelium of nile tilapia *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. *Pesq. Vet. Bras.*, 27, 103-109, 2007.

FISCHER-SCHERL, T., VEESER, A., HO!MANN, R. W., KUENHAUSER, C., NEGELE, R. D., AND EWRINGMANN, T. Morphological elects of acute and chronic

atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 20, 454-461, 1991.

FLETCHER, T.C. Defence mechanisms in fish. In: Biochemical and biophysical perspectives in marine biology. Vol. IV. Malins D.C. and Sargent J.R. (eds.). Academic Press. London, 189-222, 1978.

FRACÁCIO R.; VERANI N.F.; ESPÍNDOLA E.L.G.; ROCHA O.; RIGOLIN-SÁ O.; ANDRADE C.A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (*Piscis, ciprinidae*) exposed to the toxic sediments. Braz. Arch. Biol. Technol., 46, 685-695, 2003.

GAETANI, G.F. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. Blood., 73, 334-339, 1989.

GIDDINGS, J.M.; ANDERSON, T.A.; HALL, L.W.; JR KENDALL, R.J.; RICHARDS, R.P.; SOLOMON, K.R.; WILLIAMS, W.M. A Probabilistic Aquatic Ecological Risk Assessment of Atrazine in North American Surface Waters. Pensacola, FL: SETAC Press. 2005.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLISON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. Environ. Int., 26, 483-495, 2001.

GRECO, A.M.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol., 198, 2557-2567, 1995.

GROBLER, E., VAN VUREN, J.J.J.; DU PREEZ, H.H. Routine oxygen consumption of *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae) following acute exposure to atrazine. Comp. Biochem. Physiol., 93, 37-42, 1989.

GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; AHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dan Lake, Turkey. *Environ. Int.*, 30, 605-609, 2004.

HALL, J.C.; VAN DEYNZE, T.D.; STRUGER, J.; CHAN, C.H. Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4-D. *J. Environ Sci. Health*, 28, 577-98, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free raricals in biology and medicine. 3° ed. UK: Oxford University Press. 936p, 2000.

HANDY, R.D.; EDDY, F.B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. *J. Fish Biol.*, 35, 737-747, 1989.

HANKE, W., GLUTH, G., BUBEL, H., MÜLLER, R., Physiological changes in carps induced by pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 7, 229–241, 1983.

HEATH, A.G., *Water Pollution and Fish Physiology*. 2 ed. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R., R. Kimerle, P. Mehrle & H. Bergman (Eds.). *Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress*. Boca Raton, Lewis Publishers, 155-195, 1992.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 136, 593–620, 2003.

HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide and low-density lipoprotein oxidation. *Free. Rad. Res.*, 28, 593-600,1998.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.* 25, 563–575, 1973.

HORISBERGER, J.D. Recent insights into the structure and mechanisms of the sodium pump. *Physiology*, 19, 377–387, 2004.

HOWARD, P.H. *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals*. Chelsea, MI: Lewis, 1991.

HUGHES, G. M. Scanning electron microscopy of the respiratory surfaces of trout gills. *J. Zool.*, 188, 443-453, 1979.

HWANG, P.P.; LEE, T.H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp. Biochem. Phys.*, 148, 479– 497, 2007.

JAVARONI, R.C.A.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo da cana-de-açúcar. *Química Nova.*, 22, 1, 1999.

JAYACHANDRAN, K.; PUGAZHENDY, K. Histopathological Changes in the Gill of *Labeo rohita* (Hamilton) Fingerlings Exposed to Atrazine. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 4, 219-221, 2009

JIANG, Z.Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLF, S. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange – Comparison with TBA assay and on iodometric method. *Lipids.*, 26, 853-856, 1991.

JIMENEZ, B.D.; STEGEMAN, J.J. Detoxification enzymes as indicators of environmental stress on fish. In: Adams, S.M. (Ed.). *Biological Indicators of Stress in Fish*. Bethesda: American Fisheries Symposium, 8, 67-79, 1990.

JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; CHEN, L.; SUN, L.; QIAN, H.; LIU, W.; FU, Z. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, 78, 846–852, 2010.

JOHN, S.; KALE, M.; RATHORE, N.; BHATNAGAR, D. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *J. Nutr. Biochem.*, 12, 500-504, 2001.

JÖNSSON, E.M.; BRANDT I., BRUNSTRÖM B. Gill filament-based erod assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. *Environ. Sci. Technol.*, 36, 3340-3344, 2002

JORDÃO JR, A.A.; CHIARELLO, P.G.; BERNARDES, M.S.M.; VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. *Medicina.*, 31, 434-449, 1998.

KAMIYA, M.; UTIDA, S. Changes in activity of sodium–potassium-activated adenosinetriphosphatase in gills during adaptation of the Japanese eel to sea water. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26, 675–685, 1968.

KARNAKY K.J. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. *Am. Zool.*, 26, 209–24,1998.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. *J. Biol. Chem.*, 251, 6183-6188, 1976.

KOLPIN D.W.; SNECK-FAHRER D.; HALLBERG G.R.; LIBRA R.D. Temporal trends of selected agricultural chemicals in Iowa's groundwater, 1982–1995, are things getting better? *J. Environ. Qual.*, 26, 1007–1017, 1997.

KOOKANA, R.S.; BASKARAN, S.; NAIDU, R. Pesticide fate and behavior in Australian soils in relation to contamination and management off soil and water: a review. *Aust. J. Soil Res.*, 36, 715-64, 1998.

KULTZ, D.; SOMERO, G.N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*, *J. Exp. Biol.*, 98, 1883–1894, 1995.

KUNDU, R.; LAKSHMI, R., MANSURI, A.P. The entry of mercury through the membrane: an enzymological study using a tolerant fish *Boleophthalmus dentatus*, *Proc. Acad. Environ. Biol.*, 1, 1–6, 1992.

KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. *Methods Mol Biol.*, 32, 9–15, 1994.

LAMOUREUX, G. L., AND RUSNESS, D. G. The role of glutathione and glutathione S-transferase in pesticide metabolism, selectivity, and mode of action in plants and insects. *In* "Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, IIIB" (D. Dolphin, R. Poulson, and O. Avramovik, Eds.). Wiley, New York. 1989.

LAURENT, P. Internal morphology of the gill. Pp. 73-183. *In*: Hoar W. S. & D. J. Randall (Eds.). *Fish Physiology*, vol X. Orlando, Academic Press, 454p. 1984.

LAURENT, P.; HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. *Canadian Journal of Zoology*, 67, 3055-3063. *In*: Laurent P. Gill internal morphology. *Fish Physiology*, edited by Hoar WS and Randall DJ. Orlando, FL: Academic, 1984, 73–183, 1989.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. Environmental effects on fish gill morphology. *Physiol. Zool.*, 64, 4–25, 1991.

LEDY, K.; GIAMBERINI, L.; PIHAN, J.C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium-containing stream water. *Dis. Aquat. Org.*, 56, 235-240, 2003.

LEV, R.; SPICER, S.S. Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, 2, 309-309, 1964.

LIEBLER, D.C.; REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: Wallace, K.B. (ed). Free Radical Toxicology. USA: Taylor & Francis, p41-171, 1997.

LIN, C.H.; TSAI, R.S.; LEE, T.H. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138, 287– 295, 2004.

LIN, T.; WEN, Y.; JIANG, L.; LI, J.; YANG, S.; ZHOU, Q. Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity. *Chemosphere*, 72, 122–128, 2008.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 42, 656–666, 2001.

LOWE-MCCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes neotropicais. Edusp. São Paulo, 1999.

MACEK, K.J.; BUXTON, K.S.; SAUTER, S.; GNILKA, S.; DEAN, J.W. Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fishes. EPA 600/3-76-047. U.S., 1976.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. UNOPAR Cient., *Ciênc. Biol. Saúde*, Londrina, 1, 63-76, 1999.

MACHADO, M.R.; FANTA, E. Effects of organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46, 361-372, 2003.

MACHADO, R.F. Reflexos do mecanismo de ação dos herbicidas na qualidade fisiológica e na atividade enzimática em sementes de arroz. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas, 2005.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, 630-648, 1985.

MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.; ZAIA., D.A.M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.*, 64, 797-807, 2004.

MASUI, D.C.; FURRIEL, R.P.M.; SILVA, E.C.C.; MANTELATTO, F.L.M.; MCNAMARA, J.C.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H.M.; FONTES, C.F.L.; LEONE, F.A. Gill microsomal (Na⁺K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. *Int.J. Biochem. Cell Biol.*, 37 2521–2535, 2005.

MATSUMOTO, J.; HOSMER, P.J.; VAN DER KRAAK, G. Survival and iono-regulatory performance in Atlantic salmon smolts is not affected by atrazine exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 152, 379–384, 2010.

MAZON, A.F.; FERNANDES, M.N. Toxicity and Differential Tissue accumulation of Copper in the Tropical Freshwater Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Cont. Toxicol.*, 63, 797-804, 1999.

MAZON, A.F.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.*, 62, 621–631, 2002.

McCAHON, C.P.; PASCOE, D.; KAVANAGH, M. Histochemical observations on the salmonids *Salmo salar* L. and *Salmo trutta* L. and the ephemeropterans *Baetis rhodani* (Pict.) and *Ecdyonurus venosus* (Fabr.) following a simulated episode of acidity in an upland stream. *Hydrobiology*, 153, 3-12, 1987.

McCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244, 6049-6055, 1969.

McDONALD, D.G.; MILLIGAN, C.L. chemical properties of the blood. in fish physiol. hoar, w.s., randal, d.j., farell, a.p. (Eds.), Academic Press, San Diego, CA. XII, p55-133, 1992.

McMANUS, J.F.A. Histological and histochemical uses of periodic acid. Stain Technology, 23, 99-108, 1948.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. Annu. Rev. Biochem., 52, 711–760, 1983.

MELANCON, M.J. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In: Handbook of ecotoxicology (HOFFMAN, D.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.; CAIRNS, J.).Ed. Boca raton. Lewis, 1995.

MODESTO, K.A. Efeitos de dois herbicidas à base de glifosato para um peixe neotropical, com enfoque nos biomarcadores bioquímicos. Londrina. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Londrina. 2009.

MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.N. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). Ecotoxicology, 19,105–123, 2010.

MOORE, A.; SCOTT, A.P.; LOWER, N.; KATSIADAKI, I.; GREENWOOD, L. The effects of 4-nonylphenol and atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. Aquaculture, 222- 253, 2003.

MORON, S.E.; OBA, E.T.; ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. J. Exp. Zool., 298, 93-104, 2003.

MORON, S.E.; POLEZ, V.L.P.; ARTONI, R.F.; RIBAS, J.L.; TAKAHASHI, C.H.K. Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de

micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida Atrazina. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 1, 27-30, 2006.

MORON, S.E.; ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. Neotrop. Ichthiol., 7, 491-498, 2009.

MORRISON J.F.; GUYNN, S.R.; SCOFIELD, M.A.; DOWD, F.J.; PETZEL, D.H. Warm acclimation changes the expression of the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit isoforms in Antarctic fish gills. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 333, 129-139, 2006.

MOWRY, R.W. Alcian blue techniques for the histochemical study of acidic carbohydrates. J. Histochem. Cytochem., 4, 407-408, 1956.

NESKOVIC, N.K.; ELEZOVIC, I.; KARAN, V.; POLEKSIC, V.; BUDIMIR, M. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). Ecotoxicol. Environ. Saf., 25, 173–182, 1993.

NIEVES-PUIGDOLLER, K.; BJÖRNSSON, B.T.; MCCORMICK, S.D. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. Aquat. Toxicol., 84, 27–37, 2007.

NOLAN, D.T. Skin response of fish to stressors. Tese (Doutorado). Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, 2000.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free Radic. Biol. Med., 31, 1287–1312, 2001.

NOVARTIS. Summary of Environmental Fate of Atrazine. Greensboro, NC: Novartis Crop Protection, Inc. No. Study No. 1213-99. 2000.

NWANI, C.D.; LAKRA, W.S.; NAGPURE, N.S.; KUMAR, R.; KUSHWAKA, B.; SRIVASTAVA, S.K. Toxicity of the Herbicide Atrazine: Effects on Lipid Peroxidation and Activities of Antioxidant Enzymes in the Freshwater Fish *Channa Punctatus* (Bloch). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 7, 3298-3312, 2010.

ORFÃO, L.H. Resfriamento e criopreservação de sêmem de curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836). Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, 2006.

ORTIZ, J.B.; GONZALEZ DE CANALES, M.L.; SARASQUETE, C. Cuantificación y alteraciones histopatológicas producidas por cocentraciones subletales de cobre en *Fundulus heteroclitus*. *Cienc. Mar.*, 25, 119-143, 1999.

ORUC, E.O.; SEVGILER, Y.; UNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comp. Biochem. Physiol.*, 137, 43-51, 2004.

PEARCE, A.G.E. *Histochemistry-theoretical and applied*. Vol. II. Edinburgh/London, Churchill Livingston Inc., 441-1055. 1985.

PERRY, S.F.; GOSS, G.G.; FENWICK, J.C. The interrelationship between gill chloride cell morphology and calcium uptake in freshwater teleost. *Fish Physiol. Biochem.*, 10, 327–337, 1992.

PERRY, S.F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Ann. Rev. Physiol.*, 59, 325–47, 1997.

PETERS, J.W.; COOK, R.M. Effects of atrazine on reproduction in rats. *Bulletin of Environ. Cont. Toxicol.*, 9, 301-304, 1973.

PISAM, M.; RAMBOURG, A. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *Int. Rev. Cytol.*, 130, 191–232, 1991.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R., Lloyd, R. Sublethal and Chronic Effects of pollutants on Freshwater fish. Oxford: Fishing News Books, 30, 339–352, 1994.

POWELL, M.D., SPEARE, D.J., WRIGHT, G.M. Comparative ultrastructural morphology of lamellar epithelial, chloride and mucous cell glycocalyx of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Gill. J. Fish Biol., 44, 725 – 730, 1994.

POWELL, M.D. Respiration in infectious and non-infectious gill diseases. p. 317-339. In: Fernandes, M.N.; Glass, M.L.; Rantin, F.T.; Kapoor, B.G. (Eds.). Fish Respiration and Environment. Enfield, Science Publisher, 392p. 2007.

PRASAD, T.A.V.; REDDY, D.C., Atrazine toxicity on hydromineral balance of fish, *Tilapia mossambicus*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 28, 313–316, 1994.

QUABIOUS, E.S.; BALM, S.E.; WENDELAAR-BONGA, S.E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. Gen. Comp. Endocrinol., 108, 472-482, 1997.

RAJBANSHI, V.K.; GUPTA, A.K. Alterations in the architecture of gill surface produced by water-borne copper in *Hepteteroneusters fossilis* (Bloch). Acta Hydrochim. Hydrobiol., 16, 325-332, 1988

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; MCCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: Rand, G.M. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment. 2ed. Ed. Taylor & Francis. 1995.

RANDALL, D. Blood flow through gills. In-Gills. Cambridge University Press. pp. 173-192. 1982.

READMAN, J.W.; ALBANIS, T.A.; BARCELO, D.; GALASSI, S.; TRONCZYNSKI, J.; GOBRIELIDES, G.P. Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: results from a MED POL pilot survey. Mar. Pollut. Bull., 26, 613-9, 1993.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. The check list of the freshwater fishes of south and central America. Edipucrs. Porto Alegre, RS. 2003.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas. 5 ed. Londrina, PR 592p. 2005.

ROHR, J.R., MCCOY, K.A. A Qualitative Meta-Analysis Reveals Consistent Effects of Atrazine on Freshwater Fish and Amphibians. Environ. Health Perspct., 118, 20-32, 2010.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F.J.; ROSETY, M.; ROSETY, J.M.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. Ecotoxicol. Environ. Saf., 51, 223-228, 2002.

RUAS, C.B.G.; CARVALHO, C.S.; ARAÚJO, H.S.S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; FERNANDES, M.N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a polluted river. Ecotoxicol. Environ. Saf., 71, 86-93, 2008.

RUSSO, J.; LAGADIC, L. Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata). Environ. Poll., 127, 303–311, 2004.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M.M.; PAULINO, M.G.; FERNANDES, M.F. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. Environ Monit Assess. DOI 10.1007/s10661-010-1810-z. 2010.

SAKURAGUI, M.M.; SANCHES, J.R.; FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. J. Comp. Physiol. 173, 309-317, 2003.

SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Inhibition of Gill Na⁺,K⁺-ATPase Activity in the Eel, *Anguilla anguilla*, by Fenitrothion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38, 132–136, 1997.

SANTA MARIA, C.; VILAS, M.G.; MURIANA, F.G.; RELIMPIO, A. Subacute atrazine treatment effects on rat renal functions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 36, 325:331, 1986.

SANTANA, H.; BONANCÊA, C.E.; TAKASHIMA, K. Fotocálise eletroquímica de atrazina sobre dióxido de titânio: efeito de diferentes parâmetros experimentais, *Química Nova* volume 26 n.6, São Paulo, 2003.

SANTOS, T.G. Biomarcadores Bioquímicos e Genéticos para a Detecção dos Efeitos do Herbicida Atrazina no Peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Paraná. 2010.

SARASQUETE, C.; GISBERT, E.; RIBEIRO, L.; VIEIRA, L.; DINIS, M.T. Glyconjugates in epidermal, branchial and digestive mucous cells and gastric glands of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, Senegal sole, *Solea senegalensis* and Siberian sturgeon, *Acipenser baeri* development. *Eur. J. Histochem.*, 45, 267-278, 2001

SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 38, 995–1014, 2005.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev. Bras. Med. Esporte.*, 10, 308-312, 2004.

SCHLENK, D.; DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. *Aquaculture*, 177, 367-379, 1999.

SCHOTTLER, S.P.; EISENREICH, S.J.; CAPEL, P.D. Atrazine, alachlor and cyanazine in a large river system. *Environ. Sci. Technol.*, 28, 1079-89, 1994.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recov.*, 6, 75 – 86, 1997.

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

SHIKANO, T.; FUJIO, Y. Immunolocalization of na⁺/k⁺-atpase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. *J. Exp. Biol.*, 201, 3031–3040, 1998.

SHIMABUKUORO, R. H., SWANSON, H. R., AND WALSH, W. C. Glutathione conjugation. Atrazine detoxication mechanism in corn. *Plant. Physiol.*, 46, 103-107, 1970.

SIBBING, F.A.; URIBE, R. Regional specialization in the oro – pharyngeal wall and food processing in the carp *Cyprinus carpio*. *Neth. J. Zool. Leiden*, 35, 377 – 422, 1985.

SILVA, A.G. Alterações histológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Londrina, 2004.

SILVESTRE, F.; TRAUSCH, G.; SPANÓ, L.; DEVOS, P. Effects of atrazine on osmoregulation in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132, 385–390, 2002.

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

SINGH, A. J.; MUNSHI S.D. Scanning electron microscopic evaluation of the effects of short and long term exposure of copper and mercury on the gills of *Channa punctata* (Bloch). *J. Fresh. Biol.*, 8, 51-53, 1996.

SINGH, A.K.; BANERJEE, T.K. Toxic effects of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) on the skin epidermis of air-breathing catfish *Clarias batrachus* (L.). *Veterinarski Arhiv*, 78, 73-88, 2008.

SOLOMON, K.R.; CARR, J.A.; DU PREEZ, L.H.; GIESY, J.P.; SMITH, E.E.; KENDALL, R.J.; VAN DER KRAAK, G.J. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Crit. Ver. Toxicol.*, 38, 721–772, 2008.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M.M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 29 p, (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42), 2004.

SPADOTTO, C.A. Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos, *Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar*. São Manuel, 2006.

SPANÓ, L. TYLER, C.R.; AERLE, R.V.; DEVOS, P.; MANDIKI, S.M.N.; SILVESTRE, F.; THOMÉ, J-P.; KESTEMONT, P. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.*, 66, 369–379, 2004.

STEINBERG, C.E.W.; SPEISER, O.H. Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Water Res.*, 98, 1-5, 1995.

TEMMINK, J.B.; P. BOWMEISTER, P.; DEJONG, J.; VAN DEN BERG. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquat. Toxicol.*, 4, 165-179, 1983.

THERIEN, A.G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 279, C541–C566, 2000.

THOMSON, A.J.; SARGENT, J.R. Changes in the levels of chloride cells and (Na⁺⁺K⁺)-dependent ATPase in the gills of yellow and silver eels adapting to sea water. *J. Exp. Zool.*, 200, 33–40, 1977.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAN, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARIKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Poll.*, 121, 307-320, 2003.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático, *Biológico*, 64, 135–142, 2002.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microorganismos degradadores de atrazine provenientes de solos da Região do Aquífero Guarani. *Plantio Direto, Passo fundo, RS*, 2001.

VAN DER HEUVEL. M.R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MACKINNON, M., DIXON, D.G. Disease and gill lesions in yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining – associated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 46. 334 – 341, 2000.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol. Pharmacol.*, 13, 57–149, 2003.

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

VENTURA, B.C.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A.; Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pest. Biochem. Physiol.*, 90, 42-51, 2008.

VERMEULEN, N.P.E., Role of metabolism in chemical toxicity. In: Ioannides, C. (Ed.), *Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, p29-53. 1996.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44, 69-84, 1997.

VIDAL, R.A.; MEROTTO Jr, A. Herbicidas inibidores de ACCase. *Herbicidologia/Vidal, R.A., Merotto Jr, A.(Editores) – Porto Alegre*, 15 – 24. 2001.

WARING, C.P.; MOORE, A. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquat. Toxicol.*, 66, 93-104, 2004.

WATSON, A.J.; BARCROFT, L.C. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in bioscience*, 6, 705-730, 2001.

WENDELAAR BONGA, S.E.; LOCK, R.A.C. Toxicants and osmoregulation in fish. *Neth. J. Zool.*, 42, 478-493, 1992.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *Physiol. Rev.*, 77, 591–625, 1997.

WESTER, P.W.; CANTON, J.H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100, 115-117, 1991.

WESTER, P.W.; VAN DER VEN, L.T.M.; VETHAAK, A.D.; GRINWIS, G.C.M.; VOS, J.G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 11, 289-295, 2002.

WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C.; PFLUGMACHER, S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 49, 199–205, 2001.

WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J.L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: Val, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, 299-312. 1996.

WILHELM-FILHO, D.; TORRES, M.A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R.C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 244, 349-357, 2005.

WILSON, J.M.; LAURENT, P. Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.*, 293, 192–213, 2002.

WINKALER, E.U.; SILVA, A.G; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum Maringá*, 23, 507-514, 2001.

WINKELMANN, D.A.; KLAINE, S.J. Degradation and bound residue formation of four atrazine metabolites, deethylatrazine, deisopropylatrazine, dealkylatrazine and hydroxyatrazine, in a western Tennessee soil. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 347–354, 1991.

WONG, C. K. C.; WONG, M. H. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.*, Amsterdam, 48, 517–527, 2000.

YADWARD, V.B.; KALLAPUR, V.L.; BASALINGAPPA, S. Inhibition of gill Na⁺, K⁺-ATPase activity in dragonfly larva, *Pantala flavesens*, by endosulfan, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44, 585–589, 1990.

ZHANG, J.; SHEN, H.; WANG, X.; WU, J.; XUE, Y. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. Chemosphere, 55, 167-174, 2004.

ZUPAN, I.; M. KALAFATIC. Histological Effects of Low Atrazine Concentration on Zebra Mussel (*Dreissena polymorpha* Pallas). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 70, 688 – 695, 2003.