

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 *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades

Vinicius Cavicchioli Azevedo

São Carlos
2013

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 *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades.

Vinicius Cavicchioli Azevedo

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
2013

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

C382ee

Cavicchioli-Azevedo Vinicius.

Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades / Vinicius Cavicchioli Azevedo. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
88 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Osmorregulação. 3. Estresse oxidativo. 4. Histopatologia. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

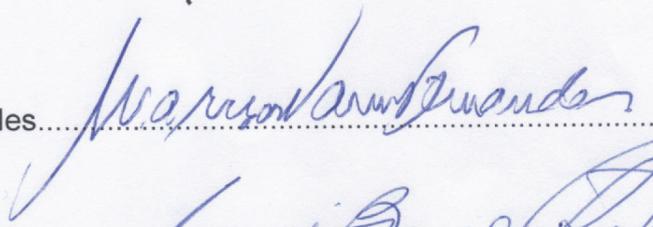
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

Dissertação de Mestrado de Vinicius Cavicchioli Azevedo

Dia 28/06/2013

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



Profª. Drª. Claudia Bueno dos Reis Martinez.....



Profª. Drª. Marcela Bianchessi da Cunha Santino.....



“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.”

(Confúcio)

“Enquanto eu tiver perguntas e não houver respostas... continuarei a escrever”

(Clarice Lispector)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por me dar forças para continuar e por ter colocado na minha vida um destino com muitos desafios e muitas alegrias. Acredito no destino, que nada acontece por acaso e que sim, podemos seguir assim como dificuldades para que com elas eu pudesse crescer como pessoa e espírito.

Aos meus pais pela base me dada, pelo carinho, dedicação, por sempre acreditarem em mim e nunca me deixarem desistir. De me mostrarem o caminho da luta e de não me deixar abalar com uma simples derrota. Por me ensinar que a vida tem altos e baixos e que não podemos desanimar nos baixos e nem se vangloriar nos altos.

Ao meu irmão, tios, tias, primos, prima avó e avô pela confiança, carinho, amor e brincadeiras. Pelos momentos de união e pela força que me deram nas minhas decisões.

A minha orientadora Marisa Narciso Fernandes por aceitar tão abertamente meu projeto, pelo incentivo e pelos ensinamentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela bolsa de mestrado

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática – INCT-TA pelo financiamento do projeto

Aos professores que aceitaram ser indicados para compor a banca examinadora desse trabalho.

Ao Programa interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF

Ao Alexandre, secretário do PIPGCF, por sempre responder meus questionamentos, por tirar minhas dúvidas e por sempre estar disponível para ajudar.

Ao Prof. Dr. Alcir Luiz Dafre por permitir o uso do laboratório de defesa celulares para realização das aclimações e exposições deste trabalho, por toda a ajuda prestada, conselhos e ensinamentos.

A M.^a. Daiane Acosta do Santos, por me ensinar a coletar, manusear e cuidar dos *P. vivípara*, assim como pela ajuda essencial na dissecação e coleta dos órgãos.

Ao M.e. Clei Endrigo Piazza, por me ensinar a distinguir machos e fêmeas de *P. vivípara*, por ceder sua casa durante o tempo que fiquei em Florianópolis para realização da primeira leva de experimentos.

Ao M.e Rafael Trevisan e a M.^a Danielle Mello, pela companhia durante o período que fiquei em Florianópolis e pela amizade.

A todos do laboratório de defesas células da UFSC pela ajuda e incentivo.

Ao Prof. Dr. Afonso Bainy por permitir o uso das armadilhas para coleta dos *P. vivípara*.

A Profa. Dra. Angélica Maria Penteado Martins Dias por permitir o uso do secador de ponto crítico e o microscópio eletrônico de varredura.

Ao INCT HYMPAR SUDESTE pela utilização do secador de ponto crítico e do microscópio eletrônico de varredura.

A Dra. Luciana Fernandes por operar o MEV e registrar as fotomicrográfiyas utilizadas nesse trabalho e também pelas conversas, conselhos e incentivo

A todos os funcionários de Departamento de Ciências Fisiológicas.

A Profa. Dra Ana Kalinin, Dra Marise Margareth Sakuragui e a Profa. Dra. Odete Rocha pelas dicas e conselhos dados durante a banca de qualificação.

A Priscila Siqueira por ser meu braço direito no laboratório, por toda a ajuda prestada, pela amizade, conversas, incentivos e muitas risadas. Pri, muitíssimo obrigado por tudo!

A Talita, Iara, Elliane, Marise, Naiara e Larissa, pelas discussões sobre as técnicas e por sanarem muitas dúvidas.

A todos os colegas do LZBC pelo convívio.

Aos colegas de disciplina por tornarem as aulas mais divertidas.

A Camila Gatto e a Grazi Deriggi Pisani, pela amizade, apoio, torcida, incentivo e por sempre me ajudar quando precisei.

A Iara da Costa Souza por sempre me divertir e mostrar que as coisas sempre podem ser melhores, por confiar no meu trabalho e contar comigo sempre que precisou, por me dar novas ideias, por me incentivar, mostrar saídas. Iara muito obrigado pela sua amizade.

A Talita Laurie Lustosa por ser minha “irmã” ao longo desses dois anos, me enchendo o saco, me divertindo e me ensinando!!! Amiga obrigado por tudo!!!

A Natieli Quinhone Pimentel e Mariana G. Barbosa por sempre me alegrarem, por toda a energia boa transmitida além do incentivo, ensinamentos e amizade!

Aos meus amigos de Bauru: Caio, Estefani, Milton, Tia Li, Reinaldo e Josiane

A todos os meus amigos de São Paulo que sempre torcem por mim.

A Camila Oliveira por apesar de longe, sempre se preocupou comigo e me deu forças para continuar apesar de tudo!!

A Mariana Rydz Pires pelas horas de conversa no Skype me fazendo companhia quando estava em Florianópolis, pela amizade incondicional, incentivo e conselhos.

Aos Amigos de Rio Grande: Mariana Lauer, Indianara Barcarolli, Isabel Soares, Mauricio Ohmada, Janaina Goulart, Felipe Barreto, Livia Leitão, Mariele Paiva, Jannine Avila e Abel Machado.

Aos Amigos distantes: Janice Goris Garcia, Gabriela Holmman, Vivian Corina de Barros, Andrea Ribeiro e Suellen Bighetti.

A todos os meus amigos da academia aquário pelo incentivo e risadas.

Ao Jack Murai por estar comigo sempre que pode, estando ao meu lado quando estive irritado, chateado, triste e feliz. Por me apoiar, me incentivar, me acalmar, me ajudar sempre que pode e por deixar a minha vida muito mais fácil e feliz. Por ter sido a pessoa que ficou do meu lado quando eu mais precisei e não ter saído do meu lado a partir daí. Muito obrigado!!!

Pensamentos:

"O Bom Combate é aquele que é travado em nome de nossos sonhos"

"Entre os Antigos, entusiasmo significa transe, arrebatamento, ligação com Deus. O Entusiasmo é Ágape dirigido a alguma idéia, alguma coisa. Todos nós já passamos por isto. Quando amamos e acreditamos do fundo de nossa alma em algo, nos sentimos mais fortes que o mundo, e somos tomados de uma serenidade que vem da certeza de que nada poderá vencer nossa fé. Esta força estranha faz com que sempre tomemos as decisões certas, na hora exata, e quando atingimos o nosso objetivo ficamos surpresos com nossa própria capacidade. Porque, durante o Bom Combate, nada mais tem importância, estávamos sendo levados através do Entusiasmo até nossa meta."

"Não existe nada de completamente errado no mundo, mesmo um relógio parado, consegue estar certo duas vezes por dia."

"O diário de um mago" – Paulo Coelho

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Contaminação das águas costeiras e estuarinas.....	1
1.2. Agrotóxicos e seus riscos ambientais.....	2
1.3. Atrazina.....	4
1.4. Peixes como bioindicadores de contaminação.....	7
1.5. Brânquias.....	8
1.6. Biomarcadores.....	11
1.6.1. Biomarcadores bioquímicos.....	11
1.6.1.1. Associados ao estresse oxidativo.....	13
1.6.1.2. Associados a ionorregulação.....	19
1.6.2. Biomarcadores Morfológicos.....	21
1.6.2.1. Alterações histopatológicas.....	21
1.6.2.2. Alterações nas CRMs.....	23
1.7. Interferência da variação da salinidade nos biomarcadores.....	24
1.8. <i>Poecilia vivipara</i>.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1. Objetivo geral.....	28
2.2. Objetivos específicos.....	28
3. HIPÓTESES.....	29

4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Animais.....	29
4.2. Delineamento Experimental (exposição à atrazina).....	30
4.3. Coleta das amostras.....	30
4.4. Análises Bioquímicas.....	31
4.4.1. Preparação das amostras.....	31
4.4.2. Determinação da concentração de proteínas totais.....	32
4.4.3. Determinação da atividade das enzimas NKA, V-HA e CA.....	32
4.4.4. Análises relacionadas ao estresse oxidativo.....	33
4.5. Procedimentos histológicos.....	34
4.5.1. Análises histopatológicas.....	34
4.5.2. Determinação da densidade e área fracional das MRCs e MCs.....	35
4.6. Tratamento estatístico.....	37
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Mortalidade.....	37
5.2. pH.....	37
5.3. Enzimas de regulação iônica.....	37
5.4. Células ricas em mitocôndria (MRCs).....	40
5.5. Estresse oxidativo.....	48
5.6. Histopatologia de brânquias.....	50

5.7. Células mucosas.....	54
6. DISCUSSÃO.....	62
6.1. Aclimação a diferentes salinidades.....	62
6.2. Exposição a atrazina em diferentes salinidades.....	66
7. Conclusões.....	72
8. Referências.....	73

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Formação do radical superóxido.....	14
Equação 2. Formação de peróxido de hidrogênio a partir do ânion superóxido.....	14
Equação 3. Redução do cobre a partir do ânion superóxido.....	14
Equação 4. Formação de hidroxila a partir do cobre reduzido e peróxido de hidrogênio.....	14
Equação 5. Formação de hidroxila a partir do ânion superóxido e peróxido de hidrogênio.....	14
Equação 6. Formação de oxigênio singlete a partir do ânion superóxido.....	14
Equação 7. Eliminação de xenobióticos através da atuação da GST.....	17
Equação 8. Formação de alcoxila e Fe^{3+} a partir da reação de peróxido lipídico com Fe^{2+}	18
Equação 9. Formação de alcoxila Fe^{2+} a partir da reação de peróxido lipídico com Fe^{3+}	18
Equação 10. Cálculo do índice de alterações histopatológicas.....	34
Equação 11. Cálculo da área Fracional das Células Ricas em Mitocôndrias.....	36
Equação 12. Cálculo da densidade das Células Ricas em Mitocôndrias.....	36
Equação 13. Cálculo da área Fracional das Células Mucosas.....	36
Equação 14. Cálculo da densidade das Células Mucosas.....	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento funcional da brânquia35
- Tabela 2.** Variação do pH da água nos diferentes tratamentos37
- Tabela 3.** Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatadas a salinidade 24 (AM) e expostas a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas52
- Tabela 4.** Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a salinidade 16 (AS-16) e expostos a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas52
- Tabela 5.** Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a salinidade 8 (AS-8) e expostos a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas53
- Tabela 6.** Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a água doce (AD) e expostos a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Grupos da triazinas. (A) 1,2,3-triazina. (B) 1,2,4-triazina. (C) 1,3,5-triazina..... 4
- Figura 2.** Fórmula estrutural da atrazina.....5
- Figura 3.** Esquema da brânquia de peixes teleósteos. Traduzido de EVANS et al., (2005).....9
- Figura 4.** Fotomicrografia mostrando os principais tipos celulares nas lamelas e filamento de teleósteos, CPi = células pilares; CPV = células pavimentosas; CRM = célula rica em mitocôndria; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 µm (CAVICCHIOLI-AZEVEDO, não publicado)9
- Figura 5.** Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura mostrando os principais tipos celulares epiteliais do filamento de teleósteos, CPv = células pavimentosas; CRM = célula rica em mitocôndria; CM = célula mucosa. Barra de escala: 10 µm (CAVICCHIOLI-AZEVEDO, não publicado) 11
- Figura 6.** Modelo esquemático ilustrando interações de biodisponibilidade e toxicidade de xenobióticos (Adaptado de FENT, 2004) 12
- Figura 7.** Modelo esquemático ilustrando a ação integrada de agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. (CAVICCHIOLI-AZEVEDO, 2011) 16
- Figura 8.** Imagem esquemática ilustrando o processo de lipoperoxidação (Adaptado de MOSIALOU, 1993) 18
- Figura 9.** A: Modelo de eliminação de NaCl de teleósteos marinhos no epitélio branquial. B: Modelo de captura de NaCl e controle ácido-base em teleósteos dulcícolas. Modificado de HWANG; LEE, (2007) e EVANS, (2008).....21
- Figura 10.** Esquema das lesões branquiais mais comuns de acordo com levantamento realizado por MALLAT (1985). (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; CRM = Célula rica em mitocôndria; CM = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sangüíneo marginal (Extraído de MACHADO, 1999, modificado de MALLAT, 1985)23
- Figura 11.** Imagem ilustrativa da espécie *Poecilia vivípara*.....27

Figura 12. Atividade da Na⁺/K⁺ ATPase ($\mu\text{M ATP}\cdot\text{mg prot}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P<0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P<0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. (n=7)38

Figura 13. Atividade da V-H⁺-ATPase ($\mu\text{M ATP}\cdot\text{mg prot}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P<0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P<0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. (n=7) 39

Figura 14. Atividade da anidrase carbônica ($\text{U}\cdot\text{mg prot}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P<0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P<0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. (n=7) 40

Figura 15. Área fracional das células ricas em mitocôndria (AFCRM) (%) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P<0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P<0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. (n=7)41

Figura 16. Densidade das células ricas em mitocôndria (MRCden) (n° células/ mm^2) de brânquias de *P. vivipara*. SW = Animais aclimatados a salinidade 24; BW-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; BW-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e FW = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P<0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle no mesmo água de aclimação ($P<0,05$)42

Figura 17. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. (A) animais aclimatados a salinidade 24 (AM). (B) animais aclimatados a salinidade 16 (AS-16). (C) animais aclimatados a salinidade 8 (AS-8). (D) animais aclimatados a água doce (AD). Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm43

Figura 18. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 24 (AM) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm44

Figura 19. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 16 (AS-16) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm45

Figura 20. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 8 (AS-8) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm46

Figura 21. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a água doce (AD) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm47

Figura 22. Capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) ($\ln(1/\text{área relativa})$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. (n=7)48

Figura 23. Atividade da glutiona-s-transferase (nM CDNB.mg prot⁻¹.mim⁻¹) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle (P<0,05). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação (P<0,05). Dados apresentados em média ± D.P. (n=7)49

Figura 24. Peroxidação lipídica (LPO) (nM TMP.mg peso úmido⁻¹) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle (P<0,05). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação (P<0,05). Dados apresentados em média ± D.P. (n=7) 50

Figura 25. Índice de alterações histopatológicas (IAH) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle (P<0,05). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação (P<0,05). Dados apresentados em média ± D.P. (n=7)51

Figura 26. Fotomicrografia ilustrando as histopatologias mais encontradas em brânquias de *P. vivipara* aclimatados a diferentes águas e expostos a diferentes concentrações de atrazina. (A) Estrutura branquial normal indicando suas respectivas estruturas. (B) Hiperplasia do epitélio lamelar (setas). (C) Descolamento epitelial (setas). (D) Proliferação de células mucosas (setas pretas); hipertrofia do epitélio lamelas (setas vermelhas). (E) Proliferação de células ricas em mitocôndrias (setas). (F) Congestão vascular (setas). (G) Contrição do sistema de células pilares (setas). (H) Dilatação do sistema de células pilares (setas pretas); fusão lamelas (setas vermelhas). (I) Aneurisma (seta). CPi = células pilares; CPV = células pavimentosas; CRM = célula rica em mitocondria; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 µm54

Figura 27. Área fracional das células mucosas (AFCM) (%) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle (P<0,05). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação (P<0,05). Dados apresentados em média ± D.P. (n=7)55

Figura 28. Densidade das células mucosas (CMden) (n° células/mm²) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$)56

Figura 29. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. (A) animais aclimatados a salinidade 24 (AM). (B) animais aclimatados a salindade 16 (AS-16). (C) animais aclimatados a salinidade 8 (AS-8). (D) animais aclimatados a água doce (AD). Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μ m57

Figura 30. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 24 (AM) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μ m58

Figura 31. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 16 (AS-16) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μ m59

Figura 32. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 8 (AS-8) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 μ g.L⁻¹ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μ m60

Figura 33. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a água doce (AD) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm61

ABREVIATURAS

ABAP = 2,2'-azobis (2 metilpropionamida)
ACAP = Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil
ATP = Adenina trifosfato
BW = Água salobra
CA = Anidrase carbônica
CAT = Catalase
CDNB = 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CFTR = canal apical de Cl⁻
Cl⁻ = Íon Cloreto
CO₂ = Dióxido de Carbono
Cpi = Células pilares
CPV = Células pavimentosas
CVS = Seio venoso central
DNA = Ácido desoxirribonucleico
ENaC = Canal de Na⁺
EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético
F = Filamento
FW = Água doce
GCL = Glutamato cisteína ligase
GPx = Glutaciona peroxidase
GR = Glutaciona redutase
GS = Glutaciona sintetase
GSH = Glutaciona reduzida
GSSG = Glutaciona oxidada
GST = Glutaciona-s -transferase
GTA = Glutaraldeído
H⁺ = Íon hidrogênio
Hc = Constante de Henry
HCO₃⁻ = Íon bicarbonato
H₂O = Água
H₂O₂ = Peróxido de Hidrogênio
H₂DCF-DA = 2',7' diclorofluoresceína
HO• = Hidroxila
IAH = Índice de Alteração Histológica
K⁺ = Íon potássio
KCl = Cloreto de potássio
Kir = Canal de K⁺
Koc = Coeficiente de partição ao carbono orgânico
Kow = Coeficiente de partição octanol-água
L = Lamela
LPO = Peroxidação lipídica
MC = Células mucosas
MDA = Malondealdeído
MCden = Densidade das células mucosas
MCFA = Área fracional das células mucosas
MRC = Célula rica em mitocôndria

MRCden = Densidade das células ricas em mitocôndrias
MRCFA = Área fracional das células ricas em mitocôndrias
Na⁺ = Íon Sódio
NaCl = Cloreto de sódio
NADPH = Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NBC = Co-transportador Na⁺/HCO₃⁻
NCC = Co-transportador Na⁺Cl⁻
NHE = Trocador Na⁺/H⁺(NH₄⁺)
NKA = Na⁺/K⁺-ATPase
NKCC = Co-transportador Na⁺, K⁺, 2Cl⁻
O₂ = Oxigênio
O₂• = Radicais superóxidos
PMFS = Fenilmetilsulfonilflúor
RNA = Ácido ribonucleico
ROH• = Alcoxila
ROO• = Radical Peroxil
ROS = espécie reativa de oxigênio
SOD = superóxido dismutase
SW = Água do mar
t^{1/2} = Tempo de meia-vida
TBA = Ácido tiobarbitúrico
V-HA = V-H⁺-ATPase
—CH₂— = Grupo metileno

RESUMO

A atrazina é um herbicida amplamente utilizado na agricultura e causa alterações bioquímicas e morfológicas em órgãos de diversas espécies. Os ambientes estuarinos são altamente dinâmicos sofrendo constantes variações das propriedades físico-químicas da água. Atualmente não existem propostas de regulamentação da descarga de contaminantes nesses ambientes que considerem as interações entre os contaminantes, as propriedades físico-químicas e a biota. Sendo poucos também os estudos que avaliam biomarcadores em animais exposto a contaminação simultaneamente com variações físico-químicas. Sendo assim o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da atrazina na regulação iônica avaliando a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase (NKA), V- H^+ -ATPase (V-HA) e anidrase carbônica (AC), alterações na morfologia das células ricas em mitocôndria (CRM) e das células mucosas (CM), o sistema antioxidante avaliando a capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), atividade da glutathione-S-transferase (GST), nível de peroxidação lipídica (LPO) e alterações histopatológicas em indivíduos de *Poecilia vivipara* aclimatadas à diferentes salinidades. Indivíduos de *P. vivipara* foram aclimatados nas salinidade 25, 16, 8‰ e água doce e posteriormente expostos a três concentrações de atrazina (2, 10 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$). A NKA aumentou com a diminuição da salinidade e mostrou respostas diferentes frente à atrazina dependendo da salinidade de aclimação dos animais. A atividade da V-HA aumentou frente à diminuição da salinidade e à exposição à atrazina aumentou a atividade da V-HA em todas as diferentes aclimações e a atividade da AC foi inibida com a diminuição da salinidade e exposição a atrazina. A densidade e área fracional das CRM aumentaram com a diminuição da salinidade e a exposição a atrazina diminuiu esses dois parâmetros em todas as salinidades. A densidade e área fracional das CMs diminuíram com a salinidade e a exposição à atrazina gerou um aumento da densidade e área fracional das CMs, sugerindo uma maior produção e liberação de muco na tentativa de evitar danos oxidativos. A ACAP e a atividade da GST nas brânquias de *P. vivipara* frente à exposição a atrazina apresentaram respostas diferentes para cada salinidade de aclimação. Os resultados demonstram que em todas as salinidades de aclimação a atrazina causa alterações no tecido branquial o que pode comprometer sua função

ABSTRACT

Atrazine is an herbicide widely used in agriculture, cause morphological and biochemical changes in organs of many species. The estuarine environments are highly dynamic under constant variations of physicochemical water. Currently there are no proposals to regulate the discharge of pollutants in environments that consider the interactions between contaminants, the physicochemical properties and biota. As also few studies, evaluating biomarkers in animals exposed to contamination with simultaneously physicochemical variations. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of atrazine on ionic regulation evaluating the activity of the enzyme Na^+/K^+ ATPase (NKA) , V-H^+ - ATPase (V-AH) and carbonic anhydrase (CA), changes in the morphology of cells rich in mitochondria (MRC) and mucous cells (MC), the antioxidant system evaluating the total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), glutathione-s-transferase (GST), level of lipid peroxidation (LPO) and histopathological changes in *Poecilia vivipara* acclimated to different salinities. Individuals of *P. vivipara* were acclimated in salinity 25, 16, 8 ‰ and fresh water and subsequently exposed to three different concentrations of atrazine (2, 10 and 100 mg L⁻¹). The NKA increased with decreasing salinity and showed different responses against atrazine depending of acclimatization salinity the animals. The activity of V - HA increased front of the reduce of salinity, exposure to atrazine increased the activity of V-HA in all the different acclimatization, and CA activity was inhibited with decreasing salinity and exposure to atrazine. The density and fractional area of MRC increased with the decrease in the salinity and atrazine exposure decreased these two parameters in all salinities. The density and fractional area of CMs decreased with salinity and atrazine exposure caused an increase in density and fractional area of CMs, suggesting an increased production and release of mucus in an attempt to prevent oxidative damage. The ACAP and GST activity in gills of *P. viviparous* after exposure to atrazine showed different responses for each salinity acclimatization. The results show that in all salinity acclimatization atrazine causes changes in gill tissue, which may compromise its function.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação das águas costeiras e estuarinas

A preocupação com a questão ambiental vem crescendo nas últimas décadas, devido principalmente ao grande crescimento industrial e ao aumento populacional (LACERDA; MALM, 2008). Aproximadamente 60% da população mundial reside em uma faixa de 100 km de terra ao longo da costa e mais de 3 bilhões de pessoas dependem, direta ou indiretamente, de recursos costeiros ou marinhos, seja para alimentação, transporte, recreação ou até mesmo para eliminação de resíduos (AWOSIKA; MARONE, 2000; MORAES, 2001).

Devido a esse contingente populacional nas áreas costeiras, o ecossistema marinho e estuarino vem sofrendo aportes constantes de diversos tipos de substâncias orgânicas e inorgânicas, originadas de atividades portuárias, lançamento de efluentes domésticos e industriais e da exploração petrolífera, e indiretamente através de precipitação atmosférica, lixiviação do solo e deságue de rios que carregam consigo aportes de toda a sua bacia de drenagem. Assim, as águas costeiras e estuarinas tornam-se receptores finais de diversos compostos de origem antrópica que podem causar desestruturação do ambiente físico, químico e alterações na dinâmica e estrutura das comunidades biológicas (CLARK, 1992, CALLISTO et al., 2001b).

A poluição em ambientes estuarinos é considerada um aspecto ambiental crítico devido à alta variação em diversos fatores abióticos que impõem severas restrições aos organismos que vivem nestas áreas (AMADO et al., 2006). Neste contexto, a homeostasia é definida como sendo a regulação que ocorre quando o efeito de uma mudança química e/ou propriedade física experimentada pelo animal é contrabalançada por uma mudança oposta em outra variável, preservando a estabilidade de um sistema fisiológico. Dentre essas respostas, a adaptação à salinidade é bem conhecida, representando mudanças nos processos associados ao equilíbrio hídrico e eletrolítico (EVANS, 2008). Por sua vez, variações de salinidade ambiental na presença de poluentes podem provocar efeitos sinérgicos sobre a adaptação à salinidade, podendo, direta ou indiretamente, interferir nos mecanismos osmorregulatórios e também gerar estresse oxidativo.

1.2. Agrotóxicos e seus riscos ambientais

A Sociedade Americana de Química (ACS) estima que exista cerca de 10 milhões de substâncias químicas citadas na literatura, sendo 70 mil de uso cotidiano e 2 mil novas substâncias são adicionadas anualmente a essa lista (CLARK, 1992). Dessa maneira, nota-se a quantidade e diversidade de contaminantes que afetam as águas costeiras e estuarinas, sendo que pouco se sabe sobre os efeitos que esses contaminantes podem causar à biota (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Devido ao crescimento populacional e a necessidade de otimização da agricultura a fim de suprir a necessidade de alimento tornou-se necessário o uso de tecnologia e produto para controle de pragas acarretando no surgimento e uso massivo de agrotóxicos mesmo considerando que essas substâncias podem gerar consequências ambientais como contaminação e poluição de diversos compartimentos como, por exemplo, a água e o solo (CHAPADENSE et al., 2009).

Entre os países consumidores de agrotóxicos, o Brasil ocupa uma posição de destaque. Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para defesa agrícola (SINDAG), o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, consumindo no ano de 2009 aproximadamente 725,6 mil toneladas dessas substâncias (FIOCRUZ, 2010; RODRIGUES, 2012). Apesar de trazerem benefícios à produção agrícola, o uso intenso de agrotóxicos pode proporcionar danos ao meio ambiente prejudicando a biota. Outro fator preocupante é que segundo KLINGMAN et al., (1982), prever o comportamento dos agrotóxicos e sua interação com o meio é um processo complicado e depende de diversas propriedades como: pressão de vapor, coeficiente de partição ao carbono orgânico (K_{oc}), constante de Henry (H_c), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), solubilidade em meio aquoso e coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}). A pressão de vapor é uma medida da tendência de evaporação de um líquido, quanto maior mais volátil será o líquido. O K_{oc} expressa a tendência do agrotóxico de adsorver no carbono orgânico do solo. O tempo de meia-vida é definido como o tempo necessário para que a metade da concentração de uma substância degrade independentemente da sua concentração inicial no meio. A constante de Henry (H_c) é usada para descrever a tendência dos produtos químicos em mover-se da fase aquosa para a fase de gás. O K_{ow} representa a tendência da distribuição de um produto químico orgânico entre as fases orgânica e a aquosa.

Para baixos valores de K_{ow} a substância é considerada hidrofílica e possui uma baixa solubilidade em gorduras, elevada solubilidade em água e pequena adsorção em solo/sedimento.

Existem várias classes de agrotóxicos 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 (YAMASHITA, 2008). Dentre agrotóxicos utilizados, os herbicidas são os mais consumidos, seguido dos inseticidas, fungicidas e acaricidas (RODRIGUES, 2012).

Os herbicidas são compostos orgânicos sintetizados utilizados na agricultura para controlar gramíneas e ervas que são indesejadas (JAVARONI et al., 1999). A ação fitotóxica de um herbicida pode ser separada em duas fases: o mecanismo de ação e o modo de ação. Entende-se por mecanismo de ação, o primeiro processo bioquímico ou biofísico no interior celular a ser inibido pela atividade herbicida. Este processo inicial pode ser suficiente para matar as plantas sensíveis. Porém, normalmente, diversas outras reações químicas são necessárias para matar a planta. O somatório total dessas reações é denominado modo de ação (MACHADO et al., 2006).

O controle químico para as espécies indesejadas 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 (fotodegradação, hidrólise e degradação 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 127 mil toneladas no ano de 2009 (IBAMA, 2010). 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. Cerca de 30% da produção mundial de pesticidas corresponde aos herbicidas do grupo das triazinas (simazina, propazina, ametrina, cianazina e atrazina) (CABRAL et al., 2003).

No Brasil, os herbicidas triazínicos vêm sendo empregados na agricultura para o controle de ervas daninhas, por inibir a fotossíntese, e são utilizados principalmente em culturas de milho, cana-de-açúcar e soja (PEREIRA, 2011). A estrutura da triazina é um anel heterocíclico análogo ao anel benzênico, mas com três átomos de carbonos substituídos por átomos de nitrogênio. Os três isômeros da triazina são distinguidos pela posição dos seus átomos de nitrogênio, e são chamados de 1,2,3-triazina, 1,2,4-triazina e 1,3,5-triazina (Figura1) (ARCHANGELO, 2003) e dentre eles, o isômero 1,3,5-triazina é o princípio ativo mais utilizado no mundo. No Brasil, há cerca de vinte formulações comerciais registradas com o ingrediente ativo atrazina (VASCONCELOS et al., 2008).

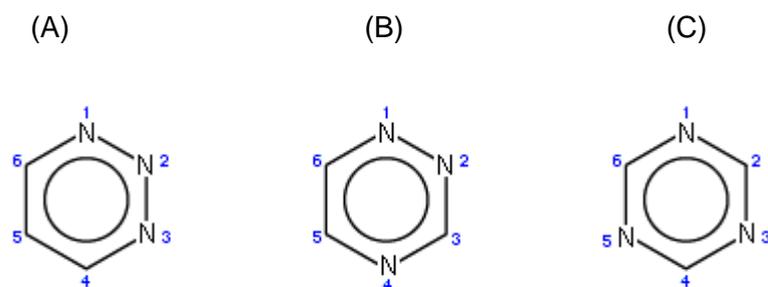


Figura 1. Grupos da triazinas. (A) 1,2,3-triazina. (B) 1,2,4-triazina. (C) 1,3,5-triazina

1.3. Atrazina

A atrazina, cujo nome químico é 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina (Figura 2) teve sua primeira comercialização na década de 1950 e desde então seu uso na agricultura se ampliou e intensificou e devido a essa ampla utilização a atrazina é um dos herbicidas mais detectados em monitoramento de ecossistemas aquáticos (SPADOTTO et al., 2004). 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).

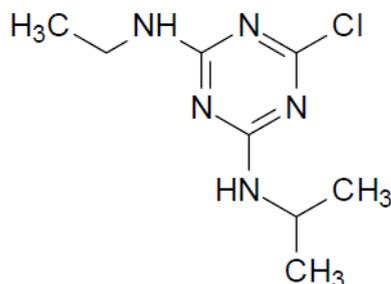


Figura 2. Fórmula estrutural da atrazina.

Por ter sido desenvolvida como um fitotóxico a atrazina é tóxica para plantas, mas também tem sido considerada tóxica para peixes (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012; PAULINO; SAKURAGUI; FERNANDES, 2012.). A atrazina é absorvida mais facilmente pelas raízes e levada, via xilema, para a parte aérea das plantas alvo (RODRIGUES; 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, consequentemente levando a uma redução no carbono e acúmulo de CO₂ na planta, levando-a a clorose foliar (GIDDINGS, 2005; SOLOMON et al., 2008).

A molécula de atrazina tem uma baixa pressão de vapor ($2,89 \times 10^{-7}$ mm em 25°C) e uma baixa constante de Henry ($2,48 \times 10^{-9}$ atm m³ mol⁻¹) e, portanto, a volatilização em superfícies ou na água é insignificante. A molécula apresenta uma moderada solubilidade em água ($33 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ em 22°C) e pequenas Kd e Koc (0,19-2,46 e 25-155, respectivamente) o que favorece que o composto permaneça no estado dissolvido em solos tratados, em águas de superficiais, subterrâneas e durante fenômenos de irrigação ou chuva. Com base nessas propriedades, a atrazina não apresenta uma forte adsorção por sedimentos sendo que sua degradação ocorre moderadamente na coluna d'água (SOLOMON et al., 1996).

Uma vez que a atrazina está na água ela pode sofrer hidrólise, adsorção, volatilização, fotólise e degradação biológica. As taxas de biodegradação e volatilização são insignificantes, sendo assim, as taxas de hidrólise e fotólise são os

principais meios de degradação desse composto. Entretanto as taxas de degradação por esses processos são relativamente pequenas podendo resultar em uma presença prolongada do composto em águas estacionárias (HOWARD, 1991; WINKELMANN; KLAINE, 1991; GRAYMORE et al., 2001; SOLOMON et al., 2008).

Outros fatores ambientais também contribuem para a dissipação da atrazina no meio ambiente. A atrazina pode ser degradada em águas estuarinas (JONES et al., 1982; ISENSEE, 1987) sendo que a meia-vida em água foi estimada na faixa de 3 a mais de 90 dias (mais curtos a salinidades elevadas) (GLOTFELTY et al., 1984). Em água doce, a meia-vida da atrazina é de 244 dias à 25°C e pH 4. As diferenças na temperatura, fonte de luz, tipo de sedimento, e concentração podem ser responsáveis por grande parte da variação nas estimativas de meia-vida da atrazina (SOLOMON et al., 2008).

No Brasil, a concentração máxima de atrazina recomendada em águas doces de classe I a classe III é de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), segundo a resolução CONAMA 357/2005 (CONAMA, 2005). Porém, não há determinação de limite em águas estuarinas e costeiras, e mesmo em águas doces as concentrações encontradas excedem ao valor máximo recomendado. A contaminação por atrazina ocorre principalmente nas águas superficiais. Em sistemas aquáticos lênticos (lagos, lagoas, zonas úmidas), a concentração de atrazina é frequentemente de 2 a 10 vezes maiores do que nos sistemas aquáticos lóticos (rios e córregos). Em ambientes estuarinos a contaminação se dá principalmente através de deságue de rios contaminados (KOLPIN, 1997; ROHR; MCCOY, 2010). As concentrações de atrazina na água variam de valores 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; SHOTTLER et al., 1994; GRAYMORE et al., 2001). Normalmente, as concentrações de atrazina encontradas em águas doces 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). Em ecossistemas estuarinos e de águas costeiras, a presença de atrazina é menor quando comparada com ambientes de água doce devido à diluição e degradação (GRAYMORE et al., 2001). Entretanto, segundo FORTIN et al. (2008),

concentrações elevadas de atrazina em torno de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ são encontradas em áreas estuarinas.

1.4. Peixes como biomonitor em estudos de contaminação

Biomonitor é uma espécie utilizada para o monitoramento de qualidade de água devido a sensibilidade ou tolerância a diversos tipos de alterações ambientais, geralmente causadas por ações antropogênicas, como poluição orgânica, assoreamento, construção de barragens, pesca predatória entre outros (WASHINGTON, 1984; AGOSTINHO et al., 2005). Os biomonitores são muito úteis por sua especificidade em relação a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente e mais tolerantes a outros (WASHINGTON, 1984).

De acordo com KARR (1981), RAMELOW et al. (1989) e SCHULZ; MARTINS-JUNIOR, (2001) os peixes são excelentes ferramentas no monitoramento de Ambientes aquáticos, servindo como importantes biomonitores, pois respondem de várias maneiras à contaminação, como por exemplo, mudanças na taxa de crescimento e na maturação sexual. Modificações na estrutura da comunidade de peixes, tais como a abundância e diversidade de espécies, também podem refletir os efeitos de vários estressores da integridade biótica do rio como um todo (FAUSCH et al., 1990).

As respostas dos peixes em relação aos mais diversos contaminantes dependem do tempo de contaminação, das concentrações do contaminante e da sensibilidade das espécies. O contato dos peixes com substâncias tóxicas leva a uma sequência de respostas fisiológicas e morfológicas que afetam o funcionamento adequado do organismo e interfere na homeostasia interna de cada indivíduo, podendo ocasionar alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas em diversos tecidos dos peixes (HEATH, 1995) e conseqüentemente, nos processos naturais de alimentação, reprodução e comportamento (SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2011).

1.5. Brânquias

As brânquias atuam como órgão alvo dos peixes para os poluentes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDŽIC, 1994). As brânquias exercem funções vitais nos teleósteos, tais como respiração, osmorregulação e excreção e ainda constituem o sítio de tomada e depuração de contaminantes e o local onde a detoxificação e o metabolismo, destes agentes tóxicos, podem ocorrer (FERNANDES et al., 2013).

As brânquias dos peixes são evolutivamente o primeiro órgão de trocas gasosas dos vertebrados e consiste essencialmente por filamentos, lamelas, uma vascularização altamente complexa (sistema artério-arterial e sistema artério-venoso), um sistema de suporte (cartilagens e ossos) e músculos envolvidos por um epitélio que proporciona uma fina barreira entre o sangue e ambiente aquático (Figura 3). Nos últimos 50 anos, estudos mostraram que o epitélio branquial é também o principal local dos ajustes de íons e pH do fluido corporal e excreção compostos nitrogenados (EVANS et al., 2005).

Na maior parte dos peixes, os filamentos branquiais são projeções longas e estreitas laterais ao arco branquial e as lamelas, que constituem a superfície respiratória, estão uniformemente distribuídas ao longo do comprimento dos filamentos formando os espaços interlamelares através dos quais a água flui (Figura 4). A lamela é essencialmente composta por duas camadas epiteliais, mantidas separadas por uma série de células individuais denominadas células pilares (CPi) cujos prolongamentos formam os espaços nos quais circula o sangue (Figura 4). As duas camadas de células epiteliais que recobrem o sistema de células pilares formam uma ampla superfície, com uma pequena distância de difusão entre a água e o sangue, em contra-corrente, que apresenta alta eficiência das trocas gasosas (Figura 3) (EVANS et al., 2005).

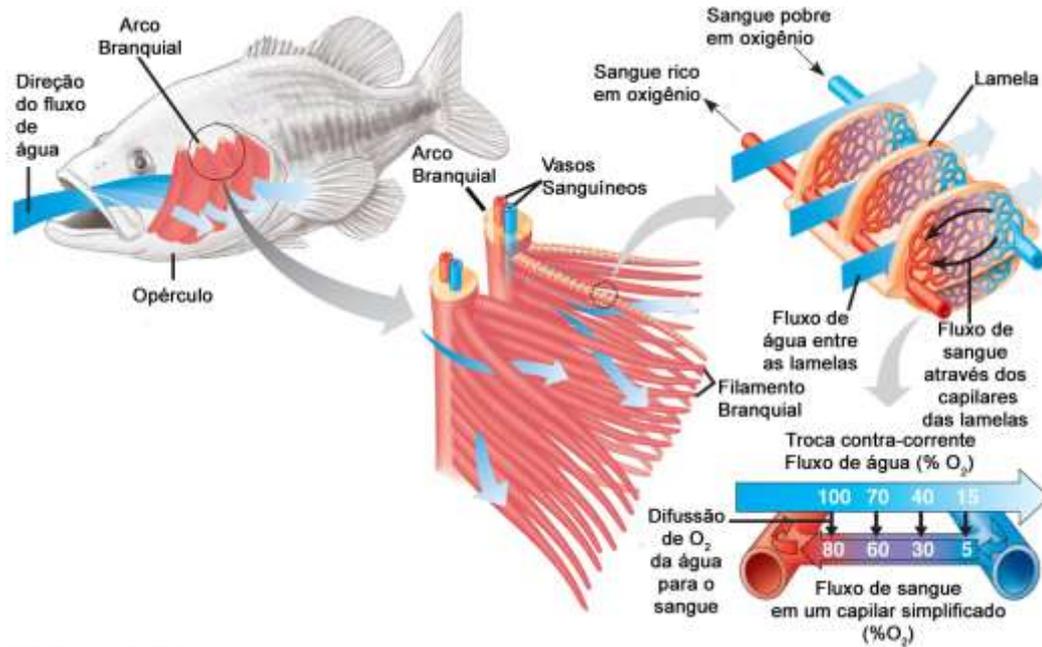


Figura 3. Esquema da brânquia de peixes teleósteos. Adaptado de EVANS et al., (2005).

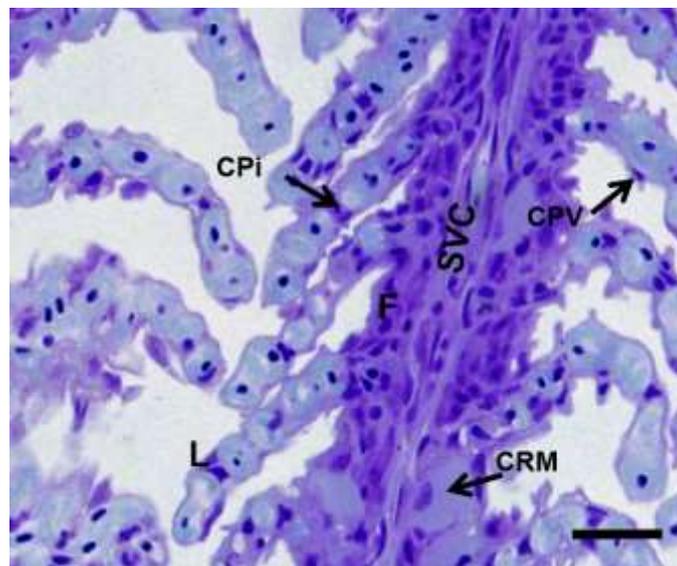


Figura 4. Fotomicrografia mostrando os principais tipos celulares nas lamelas e filamento de teleósteos, CPI = células pilares; CPV = células pavimentosas; CRM = célula rica em mitocôndria; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 µm (CAVICCHIOLI-AZEVEDO, não publicado).

O epitélio que cobre os filamentos branquiais e lamelas proporciona uma fronteira distinta entre o ambiente externo e os fluidos extracelulares e também desempenha um papel crucial na função fisiológica. O epitélio branquial é composto por vários tipos de células, sendo principalmente constituída por células pavimentosas (CPV) que compreendem 90% da superfície epitelial.

As CPVs, apesar de cobrirem a maior parte da superfície do filamento branquial e lamelas parecem desempenhar um papel passivo na fisiologia de da maioria dos peixes. A membrana apical das CPVs é caracterizada pela presença de microvilosidades que muitas vezes têm arranjos elaborados que variam entre espécies. Estas projeções apicais aumentam a superfície funcional do epitélio e podem também desempenhar um papel na ancoragem de muco (Figura 4 e 5) (EVANS et al., 2005).

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 (Figura 5) (MCCAHOON et al., 1987; HANDY et al., 1989; SINGH; MUNSHI, 1996; DEZFULI et al., 2003; LEDY et al., 2003; POWEL, 2007; SINGH; BNERJEE, 2008; MORON et al., 2009).

As células ricas em mitocôndrias (CRMs) são consideradas sítios iônicos que possuem a capacidade de absorver íons em peixe de água doce (AD) e excretar íons em peixes de água salgada (AM). As CRMs possuem polaridade e apresentam amplo sistema tubular da membrana basolateral resultando em uma grande superfície nas quais se localizam as proteínas de transporte iônico (Figura 5 e 6) (HIROSE et al., 2003; HWANG; LEE, 2007; KANG; LIU; et al., 2012). Estudos indicam que a superfície apical das CRMs em diversos teleósteos altera o tamanho e o formato dependendo da salinidade e da concentração de íons (KANG; LIU; et al., 2012; KANG; YANG; et al., 2012).

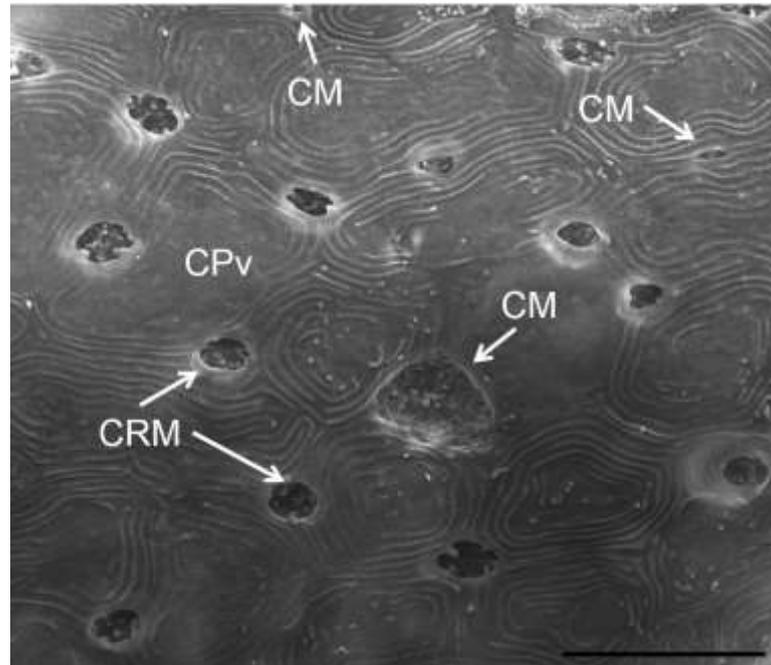


Figura 5. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura mostrando os principais tipos celulares epiteliais do filamento de teleosteos, CPv = células pavimentosas; CRM = célula rica em mitocôndria; CM = célula mucosa. Barra de escala: 10 μ m (CAVICCHIOLI-AZEVEDO, não publicado).

1.6. Biomarcadores

Biomarcadores são alterações biológicas nos fluídos corporais, células ou tecidos indicativos da exposição a concentrações subletais de poluentes ambientais, detectadas em nível molecular, celular e fisiológico (MELANCON, 1995).

Em estudos de toxicidade, biomarcadores em nível suborgânico (bioquímico, fisiológico e histológico) têm sido utilizados e considerados mais viáveis para avaliar as respostas aos estressores. Estes biomarcadores podem permitir uma avaliação mais rápida da saúde dos organismos e podem ser indicadores da exposição ou dos efeitos dos poluentes (MAYER et al., 1992).

Esta interação entre o sistema biológico, biomarcadores e poluentes está intimamente associada à biodisponibilidade dos contaminantes (Figura 6). Isto porque ele pode estar associado à matéria orgânica dissolvida, particulada e ao sedimento. Assim, sua concentração disponível é muito variável, e afetará o organismo através da relação entre sua taxa de captação e eliminação. Os efeitos diretos destes contaminantes ocorrem através de interações com proteínas receptoras celulares, distúrbios na homeostase celular, inibição enzimática, danos a

macromoléculas, entre outros (Figura 6). O organismo então é capaz de responder, inicialmente a nível molecular e celular, a fim de evitar ou diminuir o efeito tóxico destes contaminantes através de respostas adaptativas. Caso estas respostas não sejam suficientes, poderá ocasionar diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais, mutação, câncer, distúrbios comportamentais ou a morte. Entretanto, a total adaptação pode ser alcançada caso as respostas desenvolvidas pelos organismos sejam eficientes para contrabalancear os distúrbios causados pelo poluente (Figura 6) (FENT, 2004).

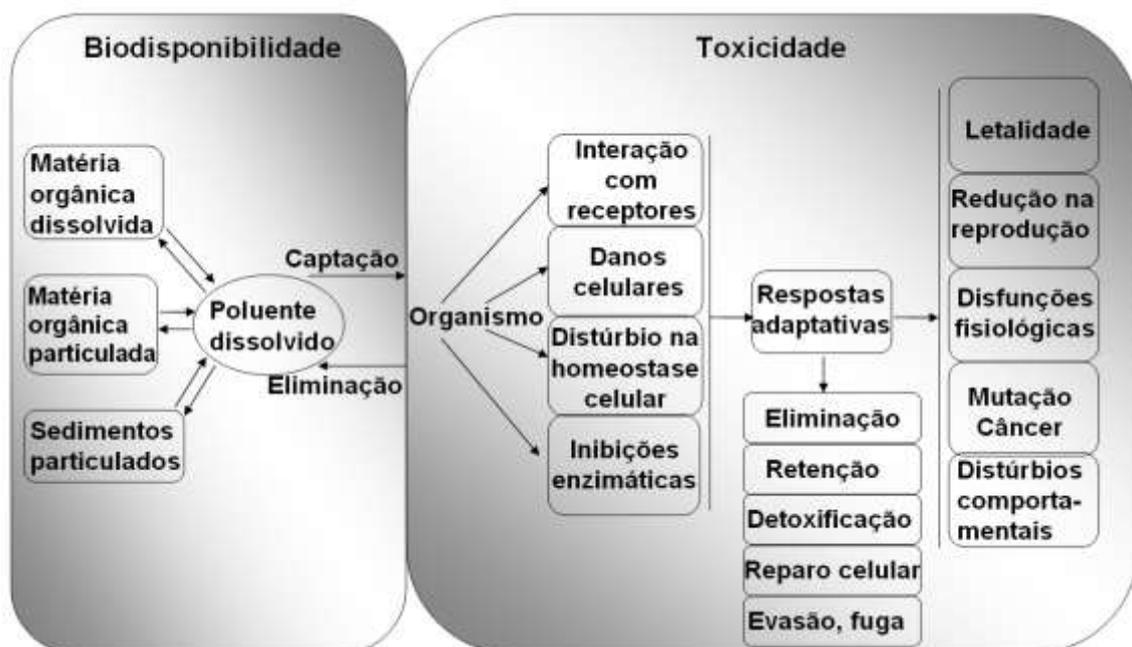


Figura 6. Modelo esquemático ilustrando interações de biodisponibilidade e toxicidade de xenobióticos (Adaptado de FENT, 2004).

Uma vez que contaminantes podem gerar alterações em vários níveis de organização biológicas existem diversos tipos de biomarcadores que podem ser avaliados para determinar a ação de um contaminante (MAYER et al., 1992). Dentre eles os biomarcadores morfológicos e os biomarcadores bioquímicos tem grandes destaque na literatura (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012; PAULINO; SAKURAGUI; FERNANDES, 2012).

1.6.1. Biomarcadores bioquímicos

1.6.1.1. Associados ao estresse oxidativo.

A maioria dos contaminantes apresenta um alto potencial oxidante, tornando as células suscetíveis a danos por espécies reativas de oxigênio (EROs) (WINSTON; DI GIULIO, 1991). Logo, a quantificação de danos oxidativos e os níveis de defesas contra danos celulares, têm o potencial de serem usados como biomarcadores de contaminação aquática (FUNES et al., 2006; AHMAD et al., 2006).

A utilização do oxigênio como acceptor final de elétrons para produção de ATP é muito vantajosa em termos energéticos, pois um organismo que utiliza respiração anaeróbica gera 2 ATPs a partir de uma molécula de glicose, enquanto organismos que utilizam a respiração aeróbica geram 36 ATPs (LEHNINGHER et al., 2005). Entretanto, a utilização de co-enzimas reduzidas (NADH e FADH₂) produzidas pelas vias metabólicas aeróbicas na cadeia transportadora de elétrons gera inúmeros tipos de EROs ao reduzir parcialmente o oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Estudos afirmam que apenas 0,1% do oxigênio consumido se torna ROS (FRIDOVICH, 2004). Entretanto, o aumento do metabolismo pode aumentar significativamente a produção de EROs. Sendo assim, todas as formas de vida aeróbica estão sujeitas aos efeitos oxidantes causados pelos metabólitos reativos de oxigênio (FRIDOVICH, 2004).

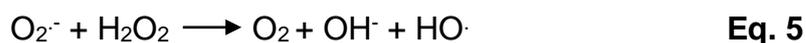
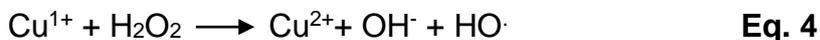
EROs são compostos que apresentam alta reatividade, podendo ser radicais, quando o átomo de oxigênio associado ou não a outro elemento possui um ou mais elétrons desemparelhados como no caso da hidroxil (HO·), superóxido (O₂⁻), radical peróxil (ROO·) e alcoila (ROH·), ou por espécies não radiculares, como o oxigênio singlet (¹O₂) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que mesmo não sendo radicais livres, possuem alta reatividade (SIES, 1985; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; BERGENDI et al., 1999; RIBEIRO et al., 2005).

O radical superóxido é a primeira das EROs formadas, podendo agir como oxidante ou como redutor, dando origem a outras espécies reativas (FRIDOVICH, 1989). Existem várias vias metabólicas onde este radical é formado, como por exemplo, a cadeia respiratória na mitocôndria, o sistema xantina/xantina oxidase, através da NADPH oxidase em células fagocíticas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema NADPH citocromo P-450 redutase

microssomal (RIBEIRO et al., 2005). Normalmente, as moléculas de oxigênio que agem como receptoras finais de elétrons são totalmente reduzidas por quatro elétrons formando água. Aquelas que são reduzidas apenas por um elétron geram o radical superóxido (Equação 1) (STOREY, 1996).



Apesar de o radical superóxido ser seletivamente reativo, ele é responsável pela geração de outras espécies reativas mais tóxicas e agressivas. Esse radical pode gerar peróxido de hidrogênio através de uma reação espontânea ou catalisada pela SOD (Equação 2), e pode gerar também o radical hidroxila através da reação de Fenton, na qual o ânion superóxido reduz principalmente o cobre ($\text{Cu}^{2+} + e^- \Rightarrow \text{Cu}^{1+}$) e o ferro ($\text{Fe}^{3+} + e^- \Rightarrow \text{Fe}^{2+}$), que por sua vez reagem com o peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxila (Equações 3 e 4) (SIES, 1985). Outra forma do radical superóxido formar o radical hidroxila é através da reação de Haber-Weiss, onde o radical superóxido reage com o peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxila (Equação 5) (SIES, 1985; RIBEIRO et al., 2005).



Além disso, o radical superóxido possui a habilidade de liberar Fe^{2+} das proteínas de armazenamento de íons metálicos, tais como ferritina e aconitase. O radical $\text{O}_2^{\cdot -}$ também reage com o radical HO^{\cdot} produzindo oxigênio singlete $^1\text{O}_2$ (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) (Equação 6).



Apesar de não ser um radical livre, o peróxido de hidrogênio é extremamente danoso e pode gerar outras EROs. Como não oxida ácidos graxos poliinsaturados, esse não-radical é potencialmente perigoso, pois tem a capacidade de facilmente atravessar membranas biológicas. Assim, o peróxido de hidrogênio produzido na mitocôndria, por exemplo, poderia se mover por todo o resto da célula e produzir efeitos em vários outros compartimentos, como o núcleo (HERMES-LIMA, 2004; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A hidroxila é um dos radicais mais reativos, pois reage com todos os tipos de moléculas com velocidade variando entre 10^7 a $10^{10} \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$. Entretanto, devido a essa rápida velocidade de reação, elas acabam sendo controladas pela taxa de difusão (HERMES-LIMA, 2004). O radical hidroxila está envolvido na iniciação da peroxidação de lipídios de membranas biológicas, bem como a oxidação e danos às proteínas, DNA nuclear e mitocondrial. Carboidratos e ácido ribonucléico (RNA) também são alvos relevantes do radical hidroxila (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Outras EROs, como o radical peroxil e alcoxila, são formadas a partir de hidroperóxidos orgânicos e radicais orgânicos centrados no oxigênio, respectivamente. Estas espécies podem agir principalmente como intermediários na peroxidação de lipídios e oxidação das demais moléculas biológicas (BERGENDI et al., 1999).

Para conter os danos oxidativos causados pelas EROs, os organismos aeróbicos apresentam adaptações, as quais são divididas em três níveis: prevenção da formação das EROs, eliminação das EROs formadas e reparo das moléculas modificadas por EROs (STOREY, 1996; RIBEIRO et al., 2005). Dentre os níveis de adaptação, se destacam os mecanismos de eliminação das EROS, que se dão por meio da atividade de enzimas (mecanismo antioxidante enzimático) e do envolvimento de moléculas que protegem alvos biológicos (mecanismo antioxidante não-enzimático).

As enzimas envolvidas no mecanismo antioxidante constituem a proteção antioxidante primária na eliminação das EROs formadas, sendo que o mecanismo clássico de eliminação ocorre através da ação das seguintes enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona-s-transferase (GST) (MICHIELS et al., 1994). O sistema antioxidante não-enzimático é composto por diversas moléculas principalmente sendo que a mais importante é o

tripeptídeo glutationa na forma reduzida (GSH). A concentração de GSH é modulada através da ação da glutathiona redutase (GR) e da glutathiona sintetase (GS). A ação integrada desses agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão representadas na figura 7.

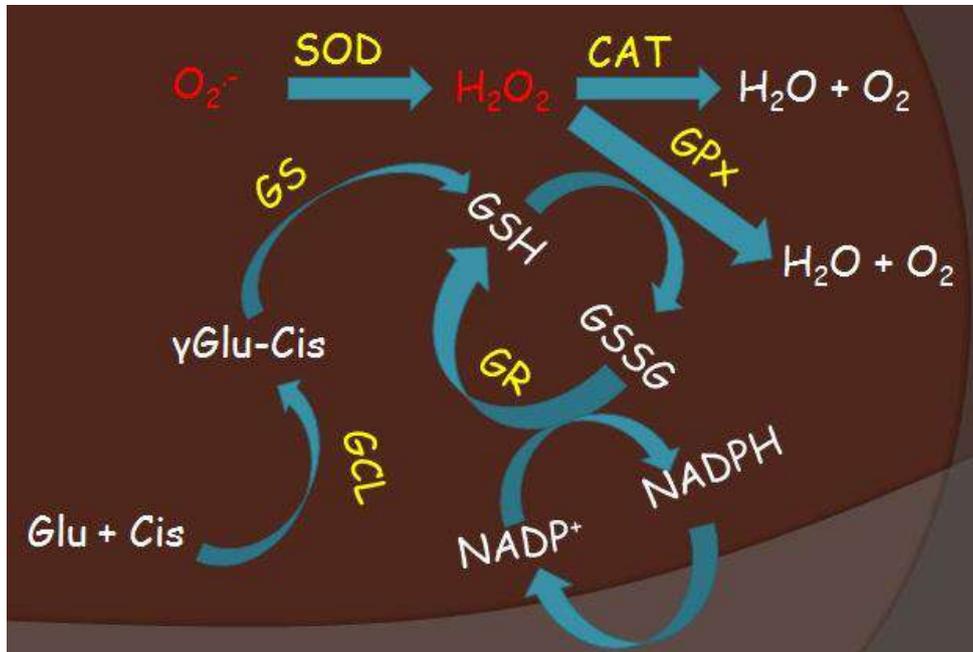


Figura 7. Modelo esquemático ilustrando a ação integrada de agentes antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. (CAVICCHIOLI-AZEVEDO, 2011).

Atualmente metodologias desenvolvidas para avaliação da capacidade antioxidante total contra determinados radicais livres estão sendo mais utilizadas pois demonstram de forma geral a capacidade do organismo de combater as EROs (AMADO et al., 2009; DÍAZ-JARAMILLO et al., 2013; MACHADO, et al., 2013). A capacidade antioxidante total contra radicais peróxil (ACAP) mensura a capacidade do tecido de evitar a produção e eliminar radicais peróxil, esse radical é um dos principais precursores da peroxidação lipídica e geralmente é degradado através da atuação da glutathiona peroxidase (RIBEIRO et al., 2005).

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, como diversos xenobióticos, por meio da conjugação desta com a GSH que formam conjugados solúveis em água facilitando a excreção desses substratos (OOST VAN DER et al., 2003; ALVES, 2012), como demonstrado na Equação 7.



Um organismo encontra-se em estresse oxidativo quando ocorre um desequilíbrio no balanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes. Quando há uma ruptura do controle e da sinalização redox e/ou ao dano molecular (SIES; JONES, 2007), o dano mais comum evidenciado em uma situação de estresse oxidativo é a peroxidação de lipídios (GIORGIO et al., 2007).

O processo de peroxidação lipídica é considerado como uma das principais causas de lesão celular e morte. Basicamente, o ataque começa nas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados (com dois ou mais carbonos de sua cadeia com ligação dupla) e é uma reação em cadeia envolvendo três etapas distintas: iniciação, propagação e terminação (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O começo desta reação geralmente ocorre através da abstração de átomo hidrogênio de um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$) através do ataque de uma molécula reativa, como EROs, metais, ou outros radicais livres, formando um radical de carbono. Este, por sua vez, realizará um rearranjo molecular, formando um dieno conjugado, o qual pode reagir com moléculas de oxigênio, formando um radical peroxil ($\text{ROO}\cdot$) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

A partir da formação deste radical ocorre a fase de propagação, devido à sua capacidade de abstrair átomos de hidrogênio de outros grupos metileno de cadeias adjacentes (transformando-se em um peróxido lipídico). Estes sofrerão processos de rearranjo molecular, formação de dienos conjugados e, posteriormente, ataque de moléculas de oxigênio, formando um novo radical peroxil. Este reinicia o processo, gerando uma reação oxidativa em cadeia (Figura 8) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

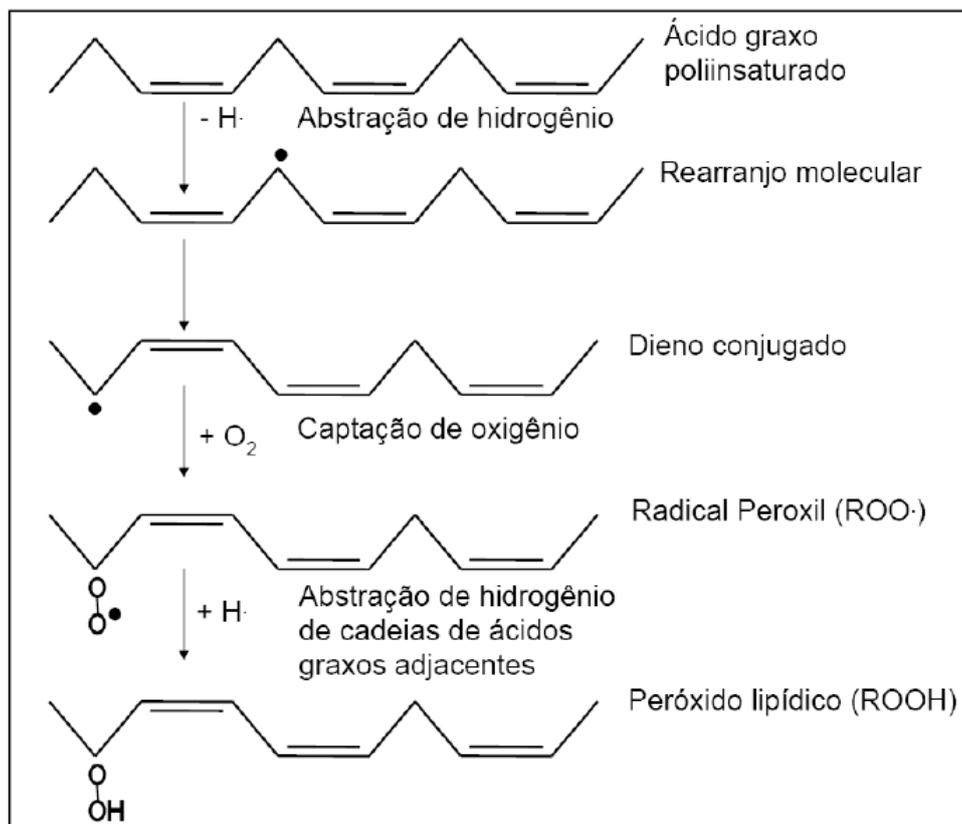


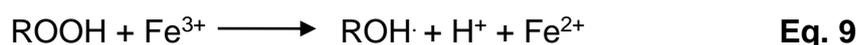
Figura 8. Imagem esquemática ilustrando o processo de lipoperoxidação (Adaptado de MOSIALOU, 1993).

Ao mesmo tempo, quando o radical peroxil abstrai o átomo de hidrogênio das cadeias adjacentes, forma-se um peróxido lipídico (ROOH) (Figura 8). Este peróxido é geralmente estável sob temperatura fisiológica, mas na presença de íons metálicos, pode iniciar um novo tipo de reação em cadeia, quebrando a ligação O-O, formando uma alcoxila (ROH·) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



Estes radicais alcoxilas também podem abstrair átomos de hidrogênio, tanto de outros peróxidos como de grupos metílicos de ácidos graxos poliinsaturados, continuando as reações em cadeia.

Outro grande problema destas reações é a formação de Fe³⁺, o qual também pode reagir com peróxidos lipídicos formando radicais peroxilas e Fe²⁺, em um ciclo autossustentável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).



Vários fatores contribuem para o término deste processo cíclico de lipoperoxidação, tais como a neutralização desses inúmeros radicais por antioxidantes, formação de produtos não radicalares, consumo dos reagentes, dentre outros. Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação, destacam-se gases de hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA). Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos (especialmente lisina). Ele ainda pode reagir com bases de DNA (especialmente guanina) gerando lesões mutagênicas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Outra importante característica do MDA é sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo pH, gerando um produto com cor que pode ser detectada em 532 nm (DRAPER; HADLEY, 1990), base para método de detecção de produtos finais de lipoperoxidação.

1.6.1.2. Associados a ionorregulação

Estudos feitos com herbicidas entre outros xenobióticos demonstram efeitos na capacidade iônica e osmorregulatória de peixes teleósteos, avaliando principalmente enzimas envolvidas nos mecanismos de transporte iônico, principalmente a Na^+/K^+ -ATPase (NKA), V-H^+ -ATPase (V-HA) e a anidrase carbônica (AC) (FERNANDES, et al., 2003; GUADALUPE CABRAL et al., 2004; OZTÜRK SARIKAYA et al., 2011; ALVES, 2012; PAULINO; SAKURAGUI; FERNANDES, 2012; NASCIMENTO et al., 2012). O mecanismo de transporte iônico assim como as proteínas envolvidas depende se o animal necessita excretar íons ou absorve-los.

Os mecanismos que envolvem a excreção de íons pelas brânquias se baseiam na presença da NKA na membrana basolateral atuando como força motriz para o transporte secundário. O transporte secundário ocorre através do co-transportador Na^+ , K^+ , 2Cl^- (NKCC) localizado na membrana basolateral provocando a entrada desses íons na célula. Posteriormente o Cl^- é excretado para o meio externo através do canal de Cl^- (CFTR), o Na^+ retorna para o meio intersticial via da ação da NKA e o K^+ , via canal de K^+ (Kir) presentes na membrana basolateral. O Na^+ é, então, excretado via paracelular entre a CRM e a célula acessória (Figura 9)

(MAETZ, 1971; KATOH; KANEKO, 2003; EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007; EVANS, 2008; INOKUCHI et al., 2008; KANEKO et al., 2008; KANG et al., 2008; YANG et al., 2011; INOKUCHI; KANEKO, 2012).

Já os modelos para absorção de íons em peixes AD estenoalinos e eurialinos aclimatados em AD divergem entre os autores, principalmente quando se trata dos mecanismos de absorção de Na^+ e Cl^- , sugerindo que os transportadores envolvidos e suas localizações na célula podem variar de espécie para espécie. Muitos autores assumem que animais de água doce possuem dois tipos de CRMs e que elas teriam mecanismo de transportes diferentes. Evans (2008) sugere um modelo diferente para cada uma das CRMs. Em um tipo de CRM a presença da NKA e de um co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ (NBC) na membrana basolateral possibilita a saída de Na^+ e HCO_3^- para o meio intersticial que também impulsiona o transporte de Na^+ da água para o interior da CRM, via trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NH}_4^+)$ (NHE). A V-HA excreta H^+ para o meio externo possibilitando a entrada de Na^+ através do canal de Na^+ (ENaC) (Figura 9).

No outro tipo de CRM, um canal de Cl^- e as enzimas V-HA e NKA na membrana basolateral promovem a saída de Na^+ , H^+ e Cl^- para o meio intersticial e impulsionam a entrada de Cl^- e Na^+ da água para célula através do trocador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e do co-transportador Na^+Cl^- (NCC). O fornecimento de íons H^+ e HCO_3^- para os dois tipos de CRMs ocorre através da atividade da anidrase carbônica (AC) citoplasmática que hidrata o CO_2 formando esses dois íons.

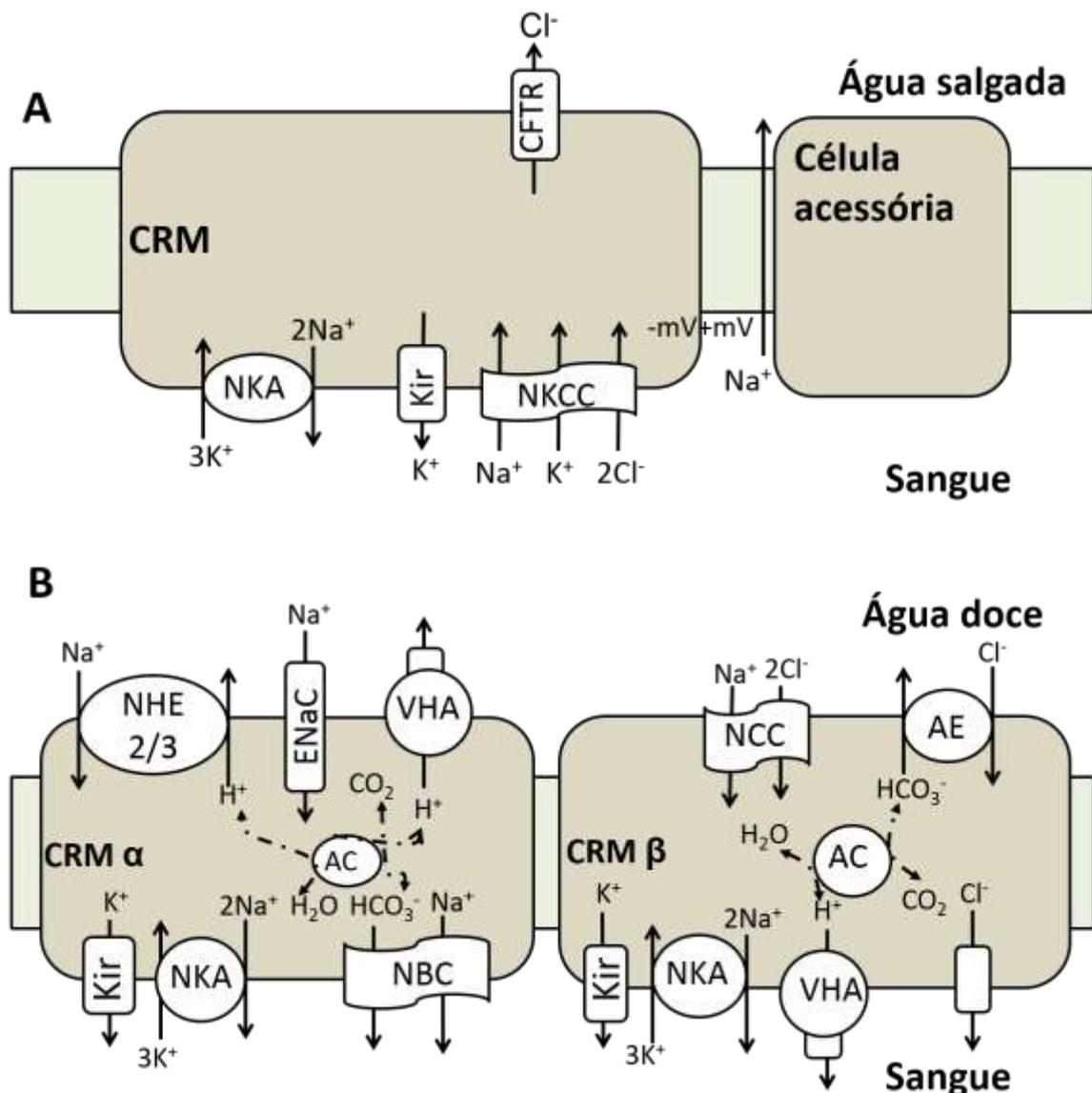


Figura 9. A: Modelo de eliminação de NaCl de teleostes marinhos no epitélio branquial. B: Modelo de captura de NaCl e controle ácido-base em teleostes dulcícolas. Modificado de HWANG; LEE, (2007) e EVANS, (2008).

1.6.2. Biomarcadores Morfológicos

1.6.2.1. Alterações histopatológicas

Alterações em nível morfológico refletem um impacto gradual no metabolismo e levam a respostas adaptativas ou degenerativas, com consequências importantes na sobrevivência do animal. Em peixes um dos órgãos mais utilizado para iônico e osmorregulação é a brânquia e uma avaliação da saúde do animal é importante para

diferenciar danos induzidos por agentes tóxicos e doenças (CHOVANEC et al., 2003; PAMPLONA, 2009).

Alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992). As alterações histopatológicas em tecidos de peixes são biomarcadores do efeito da exposição aos estressores do meio ambiente. Esta categoria de biomarcadores permite um exame específico dos órgãos e das células alvo, e como eles são afetados sob condições *in vivo*. Além disso, a histopatologia é um método eficaz para detectar os diversos efeitos da exposição aguda ou crônica nos vários tecidos e órgãos (HINTON et al., 1992).

Características histopatológicas são específicas de cada organismo e podem expressar as condições de vida do animal e representar o impacto causado no organismo, pelo poluente. As mudanças histológicas são consideradas mais sensíveis que os parâmetros relacionados apenas com o crescimento ou reprodução do indivíduo (TEH et al., 1997).

Em uma revisão que reuniu 130 estudos, MALLATT, (1985) realizou um levantamento sobre os tipos de alterações branquiais frente a agentes químicos e físicos presentes no ambiente. As alterações morfológicas mais encontradas, enfocando principalmente as regiões interlamelar e lamelar, foram: descolamento do epitélio, necrose, fusão lamelar, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia lamelar, 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 10 (MACHADO, 1999). Lesões nos tecidos aparecem em resposta a exposições subletais e a relevância da lesão depende da importância da patologia, ou seja, como afeta a função do órgão e a habilidade do peixe para restaurar as lesões e sobreviver (BERNET et al., 1999).

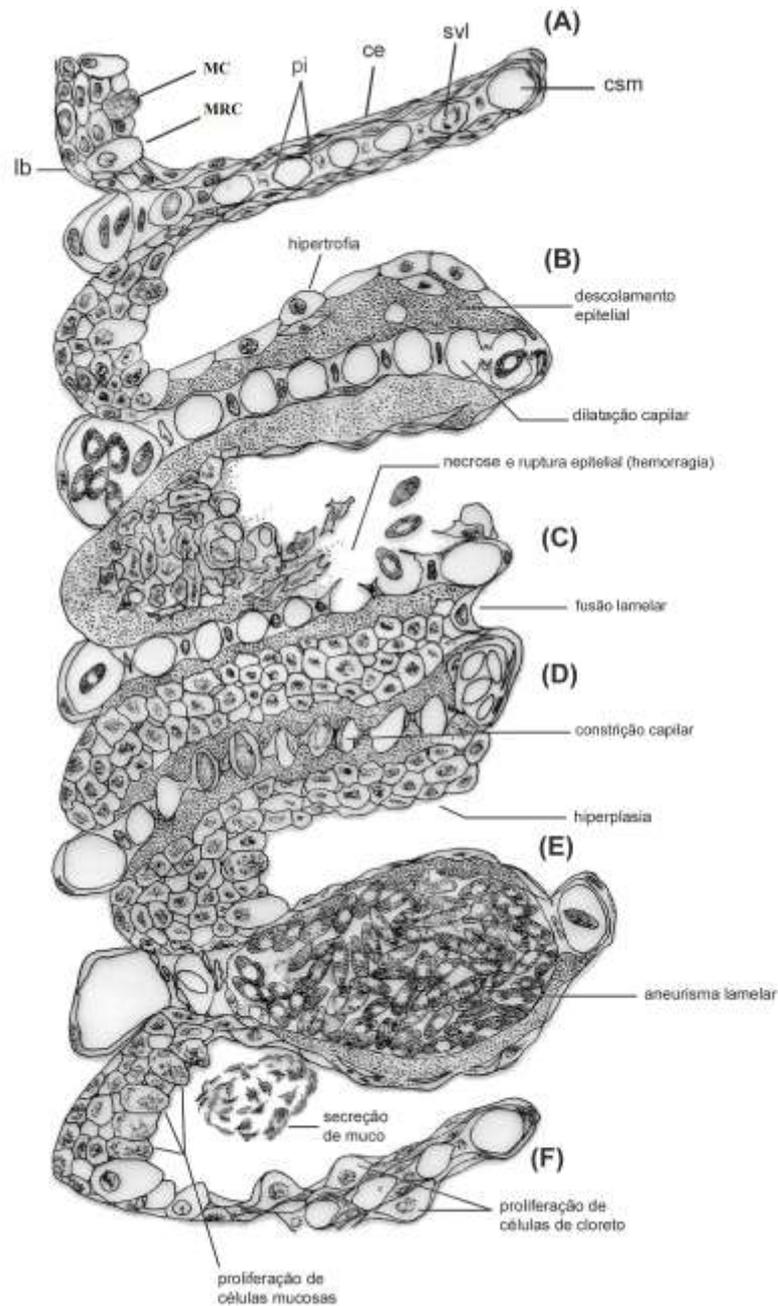


Figura 10. Esquema das lesões branquiais mais comuns de acordo com levantamento realizado por MALLAT (1985). (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; CRM = Célula rica em mitocôndria; CM = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sanguíneo marginal (Extraído de MACHADO, 1999, modificado de MALLAT, 1985).

1.6.2.2. Alterações nas CRMs

Como citado anteriormente as CRMs são consideradas sítios iônicos que possuem a capacidade de absorver íons em peixe de água doce (AD) e excretar íons em peixes de água salgada (AM). A superfície apical dessas células assim

como a sua densidade tem sido amplamente utilizada para avaliar as respostas ou alterações dessas células frente a diversas condições ambientais como a contaminação ambiental (LAURENT, 1984; PISAM; RAMBOURG, 1991; WILSON; LAURENT, 2002).

Dependendo das características físicas e químicas da água, pode ocorrer um aumento ou diminuição da densidade e alteração na superfície apical de células mucosas. Sabe-se que a proliferação e hipersecreção das células mucosas envolvidas com o sistema de defesa dos peixes frente a xenobóticos podem comprometer a função branquial, dependendo da severidade do processo (FRACÁCIO et al., 2003).

1.7. Interferência da variação da salinidade nos biomarcadores

Diversos são os estudos sobre a atividade, quantidade e localização dos transportadores relacionados ao transporte iônico e como ocorre a adaptação frente à mudança da salinidade, sendo que a maioria deles são relacionados à atividade da NKA. HWANG; LEE, TSUNG HAN, (2007) verificaram que teleósteos eurialinos exibem menor expressão da NKA branquial em ambientes com salinidades similares ao seu ambiente natural. Por exemplo, estudos realizados com *Fundulus heteroclitus* (teleósteo marinhos) expostos à AD mostraram elevada atividade da NKA, e tilápias (teleósteo dulcícola), quando transferidas para água do mar (AM) aumentaram a atividade da NKA (INOKUCHI et al., 2008; KANG; LIU et al., 2012). INOKUCHI et al. (2008) mostrou que a atividade da NKA em tilápia de Moçambique, *Oreochromis mossambicus*, é mais baixa em ambientes cuja osmolalidade interna é semelhante a externa, por exemplo quando está submetida a águas cuja salinidade é 1/3 da água do mar.

Utilizando modelo de transferência do peixe de AM para a AD, foi demonstrado um aumento na presença e a atividade da V-HA em animais aclimatados a AD, corroborando com os indícios que essa bomba está associada à absorção de Na⁺ pelas CRMs. Entretanto a atividade da VHA pode ser determinada em peixes marinhos em seu ambiente natural sugerindo que essa bomba participa da regulação ácido-base (MAETZ, 1971; KULTZ; SOMERO, 1995; PERRY, 2003; HWANG; LEE, TSUNG HAN, 2007; EVANS, 2008).

A expressão e a atividade da AC em peixes aclimatados a diferentes salinidades têm sido estudadas em diferentes espécies. *Fundulus heteroclitus* transferido de salinidades intermediárias entre AM e AD para AD aumentou a expressão da AC, 12 h após a transferência (SCOTT et al., 2005). Em *Oncorhynchus kisutch*, a atividade da AC branquial foi significativamente maior nos animais aclimatados em AM comparado com peixes de AD (ZBANYSZEK; SMITH, 1984). Entretanto, em *Platichthys flesus* não houve diferença significativa na atividade da AC entre peixes aclimatados em AM e AD (MASHITER; MORGAN, 1975).

Qualquer perturbação ambiental pode ser considerada uma potencial fonte de estresse e respostas hormonais, enzimáticas e morfológicas podem ser detectadas em peixes e em outros vertebrados (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2002; CHOI et al., 2008). Alterações metabólicas são comuns quando o organismo é submetido a algum estresse e essas alterações podem gerar EROs, uma vez que essas são produzidas normalmente em organismos aeróbicos (CHOI et al., 2008).

Dentre os fatores que aumentam a atividade metabólica em peixes está a transferência para salinidades diferentes da do habitat natural que implica em aclimação e sobrevivência nesse ambiente com salinidade diferente (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al., 2002).

Poucos estudos tem avaliado o efeito da salinidade na capacidade antioxidante em peixes e, principalmente, no tecido branquial. MARTINEZ-ALVAREZ et al (2002) verificaram a atividade antioxidante e dano lipídico nas células sanguíneas, fígado e coração de *Acipenser naccarii* durante estresse hiperosmótico. Observaram um aumento da atividade das enzimas antioxidantes nas células sanguíneas e diminuição da LPO, exceto na salinidade mais alta testada na qual houve um aumento da LPO. Outro estudo realizado com *Paralichthys olivaceus* sob estresse hiposmótico mostrou um aumento da expressão da GPx e da GST até valores de salinidade de 4‰ e uma diminuição durante exposição a água doce (CHOI et al., 2008).

Em invertebrados, as variações de salinidade induziram aumento da atividade GPx no camarão (*Litopenaeus vannamei*), mas ocorreu estresse oxidativo (LIU et al., 2007); as alterações de salinidade resultaram em aumento da atividade da GST em mexilhões do Mediterrâneo (*Mytilus galloprovincialis*) mostrando que a

salinidade pode ser um fator abiótico que induz a produção de EROs (BEBIANNI et al., 2007).

Perturbações ambientais como a salinidade podem modificar o padrão de distribuição, densidade de células mucosas assim como quantidade de secreção de muco. ABRAHAM et al., (2001) demonstrou que *Cyprinus carpio* expostos a diferentes porcentagens de água do mar por diferentes períodos alterou a superfície apical das células mucosas assim como alteração na densidade e secreção de muco.

1.8. *Poecilia vivipara*

A subfamília Poeciliinae pertencente à ordem Cyprinodontiformes é amplamente distribuída nas Américas. Poeciliinae é o grupo irmão do Procatopodinae, um grupo composto pela Sul-Americana *Fluviphylax whitley* e dos Procatopodines africanos. O clado Poeciliinae mais Procatopodinae são os grupos irmãos do Aplocheilichthyinae (COSTA, 1996; GHEDOTTI, 2000). Estas três subfamílias compõem a família Poeciliidae. Esses peixes são caracterizados pela presença de um único gonopódio derivado da modificação da dos raios 3,4 e/ou 5 da nadadeira anal dos machos (PARENTI, 1981). A família possui aproximadamente 220 espécies atualmente alocadas em aproximadamente 28 gêneros, dentre eles o gênero *Poecilia* (LUCINDA, 2003).

O gênero *Poecilia* se caracteriza por ter uma ampla diversidade, pela presença de espécies de peixes de água-doce secundários (ALDA et al., 2013) e apresentam uma notável variedade de adaptações reprodutivas (THIBAUT; SCHULTZ, 1978). Tendo desenvolvido a capacidade de fertilização interna, com várias modificações no sistema reprodutivo, como por exemplo, tamanho e número de ovos, tamanho dos embriões, tamanho dos jovens recém-nascidos, quantidade de suplemento nutricional da mãe para os embriões, grau de desenvolvimento placentário e de superfetação, variações no intervalo e períodos de gestação da prole, duração do período reprodutivo e duração da vida reprodutiva, mudando assim o conjunto de estratégias reprodutivas utilizadas (THIBAUT; SCHULTZ, 1978).

Poecilia vivipara (BLOCH; SCHNEIDER, 1801) (Figura 11) é uma espécie que apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrada nas Américas, de

Illinois, na Nova Jersey, (EUA) a Argentina (AMARAL et al., 2001). A espécie é eurialina e abundante na maioria dos ambientes aquáticos continentais lênticos, dulcícolas e estuarinos do Brasil (GOMES; MONTEIRO, 2008), sobretudo em águas rasas, calmas, de fundos argilosos com macrófitas aquáticas (MAZZONI; IGLESIAS-RIOS, 2002). Na praia dos coqueiros (Rio de Janeiro, Brasil) esses indivíduos podem ser coletados em uma variação de salinidade de 0 a 28‰ (AMARAL et al., 2001). Segundo a classificação de (LUCINDA; REIS, 2003), a espécie ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes
Subclasse: Actinopterygii
Divisão: Teleostei
Superordem: Acanthopterygii
Ordem: Cyprinodontiformes
Família: Poeciliidae
Subfamília: Poeciliinae
Tribo: Poeciliini
Gênero: *Poecilia*
Espécie: *Poecilia vivipara*

Devido à sua fácil manutenção em laboratório e grande abundância no Brasil, *P. vivipara* é utilizado como biomonitor em ambientes dulcícolas e estuarinos (CORRÊA et al., 2010) e, por estarem presentes em diferentes gradientes ambientais, suas populações são expostas a variadas condições, inclusive de exposição a poluentes (GOMES; MONTEIRO, 2008). Atualmente a espécie tem sido utilizada em estudos de efeito tóxicos de metais, herbicidas e derivados do petróleo (ZIMMER et al., 2012; MACHADO et al., 2013.).



Figura 11. Imagem ilustrativa da espécie *Poecilia vivipara* (http://farm5.staticflickr.com/4075/4735063842_a2cab5ea55_n.jpg)

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Sabendo que a atrazina é um dos herbicidas mais utilizados na agricultura e tem sido encontrado tanto em águas doces como em águas salobras (estuários) e que esse composto apresenta efeitos tóxicos nas brânquias de peixes, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial toxicológico da atrazina nas brânquias de *Poecilia vivipara* aclimatadas a quatro salinidades (25‰, 16‰, 8‰ e água doce) utilizando biomarcadores morfológicos e bioquímicos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as respostas da capacidade antioxidante em brânquias de *P. vivipara* expostos à atrazina, durante 96 h, em quatro diferentes salinidades de aclimação e se há produção de peroxidação lipídica.
- Avaliar os efeitos na osmorregulação determinando a atividade da enzima NKA, AC, V-HA, morfologia e densidade das CRMs nas brânquias de *P. vivipara* expostos à atrazina, durante 96 h, em quatro diferentes salinidades de aclimação.
- Avaliar, através de análises histopatológicas as brânquias de *P. vivipara* expostos à atrazina, durante 96 h, em quatro diferentes salinidades de aclimação.
- Avaliar o potencial toxicológico da atrazina sobre a densidade e morfologia das CM em branquiais de *P. vivipara* expostos à atrazina, durante 96 h, em quatro diferentes salinidades de aclimação.

3. HIPÓTESES

Baseado no fato de que a salinidade interfere na respostas de alguns biomarcadores, a primeira hipótese desse trabalho é que aclimatação a diferentes salinidade irá modular as respostas dos biomarcadores estudados, inclusive a resposta dos mesmo frente a exposição ao atrazina.

Quando algum animal é submetido a condições diferentes do seu habitat natural o organismo necessita realizar ajustes fisiológicos para que consiga sobreviver nessa nova condição. Entretanto quando o animal está nessa situação e ainda é exposto a um xenobótico pode haver efeito sinérgico uma vez que xenobioticos podem levar a uma desregulação fisiológica. Sendo assim a segunda hipótese desse trabalho é que a aclimatação a salinidade mais discrepante do seu habitat natural (água doce) torna o animal mais suscetíveis a efeitos danosos causado pela atrazina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Exemplares adultos de *Poecillia vivipara*, [Massa corpórea (CM) = $0,90 \pm 0,32$ g e comprimento total (Ct) = $4,03 \pm 0,49$ cm (n=420)] foram capturados em água salgada (25‰) na Barra da Lagoa em Florianópolis, SC. Os animais foram transportados para o Laboratório de Defesas Celulares (LABDEF) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, onde ficaram 48 horas antes de serem aleatoriamente divididos em quatro grupos: Grupo 1 - permaneceu em água salgada (AM), Grupo 2- foi transferido para aclimatação a salinidade 16 ‰ (AS-16), Grupo 3 - foi transferido para aclimatação a salinidade 8 ‰ (AS-8) e Grupo 4- foi transferido para aclimatação a água doce (0‰) (AD). A transferência as diferentes salinidades ocorreu através da diminuição da salinidade em 5‰ a cada 48 horas, após atingir a salinidade desejada os animais foram mantidos por mais 5 dias nessa salinidade antes de serem expostos a atrazina. Durante todo o período de aclimatação os animais foram mantidos a 25°C, fotoperíodo de 12C:12E, aeração constante e alimentação diária com ração Tetra Marine Saltwater Flakes (Tetra Importadora Ltda) *ad libitum*.

4.2. Delineamento Experimental (exposição à atrazina)

Após a aclimação a cada salinidade, os peixes de cada grupo foram divididos aleatoriamente em outros 5 grupos e foram colocados em aquários de 18 L. Cada grupo de peixes ($n = 21$) foi mantido 96 horas em sistema semi-estático com renovação de 80% da água a cada 24 horas. Os seguintes grupos foram constituídos: grupos controles (C) de aclimação (AM, AS-16, AS-8, AD) que foram mantidos sem contaminação pelo composto e sem a presença do diluente (acetona), grupos controles sem o contaminante, mas com a presença do solvente (acetona) (C solv) e os demais grupos 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 $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentração extrapolada para se observar efeito).

As concentrações de atrazina foram obtidas de uma solução estoque preparada em acetona a 10 mg mL^{-1} segundo descrito por (FORTIN et al., 2008). Durante todo o período de exposição os animais foram mantidos a 25°C , fotoperíodo de 12C:12E, aeração constante e não foram alimentados.

4.3. Coleta das amostras

No final do período de 96 horas, os peixes foram medidos, tiveram as massas determinadas 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. Outra parte das amostras foi congelada a -80°C para determinações bioquímicas.

4.4. Análises Bioquímicas

4.4.1. Preparação das amostras

Para determinar a atividade da AC, os filamentos branquiais foram homogeneizados mecanicamente e posteriormente por ultrassom (Quimis - Q335D) em uma proporção de 1:19 (massa:volume) em meio de reação frio (225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris-fosfato, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados (10.000 g; 4°C; 20 min) em microtubos de plástico utilizando centrífuga refrigerada (VS-15000CFNII). O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas e para a determinação da concentração de proteína total.

Para determinar a atividade da NKA e V-HA, filamentos brânquias foram homogeneizados mecanicamente e posteriormente por ultrassom (Quimis - Q335D) em uma proporção de 1:10 (massa:volume) com uma solução tampão contendo 150 mM de sacarose, 50 mM de imidazol, 10 mM de EDTA e 0,5% de sodium deoxycholate). Os homogeneizados foram centrifugados (4.000 RPM; 4°C; 7 min) em microtubos de plástico utilizando centrífuga refrigerada (VS-15000CFNII). O sobrenadante foi utilizado como fonte de enzimas e para a determinação da concentração de proteína total. Em seguida, as amostras foram diluídas em tampão de homogeneização para padronizar a concentração de proteína (6,5 mg mL⁻¹).

Para as análises da capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) e da atividade da glutathiona-s-transferase (GST), filamentos brânquias foram homogeneizados mecanicamente e posteriormente por ultrassom (Quimis - Q335D) em uma proporção de 1:19 (massa:volume) com uma solução tampão contendo 100 mM de Tris-HCl, 2 mM de EDTA dissódico, 5 mM de MgCl₂.6H₂O e 1 mM de PMSF. Os homogeneizados foram centrifugados (10.000 g; 4°C; 20 min) em microtubos de plástico utilizando centrífuga refrigerada (VS-15000CFNII). O sobrenadante foi utilizado como fonte de compostos antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) e para a determinação dos níveis de proteínas totais. Em seguida, as amostras foram diluídas em tampão de homogeneização para padronizar a concentração de proteína (2,5 mg mL⁻¹) para a análise da ACAP.

Para a determinação da peroxidação lipídica (LPO), as amostras de fígado e brânquias foram pesadas e homogeneizadas mecanicamente e posteriormente por

ultrassom (Quimis - Q335D) na proporção de 1:11 (massa:volume) com uma solução tampão de homogeneização contendo KCl a 1,15% e 35 μM de BHT.

4.4.2. Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais nos homogeneizados foi determinado através do método do biureto, utilizando-se um kit comercial de reagentes (Dole LTDA, Goiania, GO, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada utilizando uma leitora de microplaca (Spectramax M5, Molecular devices) a 550nm.

A concentração de proteínas totais foi utilizada posteriormente para o cálculo final de cada análise e a curva padrão foi realizada de através da diluição do padrão fornecido pelo kit.

4.4.3. Determinação da atividade das enzimas NKA, V-HA e AC

A atividade branquial da NKA e da V-HA foram determinadas seguindo a metodologia de KULTZ; SOMERO, (1995) adaptada para microplaca, que é baseada no acoplamento equimolar da atividade da ATPase de piruvato quinase e lactato desidrogenase. A atividade adquirida pela taxa de controle (sem inibidor) menos taxa com inibidor (oubaína para a quantificação da NKA e N-etimaleimida (NEM) para V-HA, medida a 340 nm utilizando uma leitora cinética de microplaca (Spectramax M5, molecular devices). A atividade foi expressa por μM de ATP hora⁻¹ mg de proteína⁻¹.

A atividade branquial da AC foi determinada segundo o protocolo descrito por VITALE et al., (1999). Resumidamente, a atividade da AC foi determinada pela adição de 7,5 mL de meio de reação em 0,05 mL de homogeneizado de tecido e 1 mL de CO₂ saturada com água destilada a 2,5°C. A variação de pH foi medido ao longo de 20 s utilizando um medidor de pH (3510 Jenway, UK). A atividade da AC foi determinada pela razão entre os declives de regressões lineares das reações não-catalisadas (branco) e catalisadas e foi expressa em U mg de proteína⁻¹.

4.4.4. Análises relacionadas ao estresse oxidativo

A capacidade antioxidante total (ACAP) foi determinada seguindo a metodologia descrita por AMADO et al., (2009) que se baseia na detecção de EROS por fluorometria (emissão: 485 nm; excitação: 525 nm), com o uso de 2',7' diclorofluoresceína (H₂DCF-DA) como substrato, e a geração de radicais peroxil nos tecidos analisados por decomposição térmica a 35°C do composto 2,2'-azobis (2 metilpropionamidina) (ABAP). A capacidade total de absorbância dos peroxiradicais é acompanhada pelo sinal de fluorescência emitido pela reação entre as EROs e o H₂DCF-DA. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Spectramax M5, Molecular Devices) com a temperatura fixada a 37°C durante 30 min em intervalos de 5 min. A ACAP foi então determinada pela diferença na área das EROs com e sem ABAP, relativa à fluorescência observada sem ABAP, sendo os dados apresentados pelo logaritmo neperiano do coeficiente de um sobre a área relativa.

A atividade da GST foi determinada utilizando o método espectrofotométrico descrito por HABIG; JAKOBY, (1981), adaptado para microplaca. A alíquota já preparada foi adicionada em poços da microplaca após foi adicionado meio de reação contendo 1 mM de CDNB, 0,1mM de tampão fosfato e 1 mM de GSH e pH 7,00. A leitura foi realizada durante 4 minutos em intervalos de 21 segundos em leitora de microplaca (Spectramax M5, Molecular Devices) a 340 nm. A atividade enzimática específica foi expressa em nM de CDNB mg de proteína⁻¹ min⁻¹.

Para a determinação dos níveis de LPO foi utilizado o método de TBARS descrito por OAKES; VAN DER KRAAK, (2003), que se baseia na reação do malondialdeído (MDA), um composto formado pela oxidação de lipídios, com ácido tiobarbitúrico (TBA), sob condições de alta temperatura e acidez. Esta reação gera o tetrametoxipropano (TMP), um cromógeno que pode ser medido por espectrofluorometria (emissão: 553 nm; excitação: 515 nm). A concentração de peróxidos lipídicos é expressa como nmol de TMP g peso úmido⁻¹. A curva padrão foi feita utilizando o reagente 1,1,3,3-tetramethoxypropane (sigma).

4.5. Procedimentos histológicos

4.5.1. Análises histopatológicas

Após a fixação as amostras foram desidratadas em bateria crescente de etanol (70-95%) por 1 hora cada e, em seguida, embebidas em etanol 95% + historesina pura (Leica, Alemanha) durante 4 horas. Posteriormente, as amostras ficaram durante a noite em historesina pura para posterior inclusão. Após inclusão, cortes histológicos foram confeccionados longitudinalmente a 3 µm em micrótomo (Micron HM 360), corados com azul de Toluidina e utilizados para análises histopatológicas. As lâminas foram finalizadas utilizando Entellan. A ocorrência de alterações histopatológicas nas brônquias foram avaliadas semi-quantitativamente da seguinte forma:

A) *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 1), segundo POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIK, (1994) e modificada por CERQUEIRA; FERNANDES, (2002). Esses dados foram utilizados para os cálculos de IAH através da seguinte fórmula:

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

Eq. 10

Onde a = alterações de estágio I, b = alterações de estágio II e c = alterações de estágio III e 10^0 , 10^1 e 10^2 são fatores para o cálculo do IAH, segundo a severidade da lesão.

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 Image-pro Plus 6.0 em microscópio de luz Olympus BX51 (Olympus, Denmark).

Tabela 1. Classificação das alterações histopatológicas quanto aos estágios de comprometimento funcional da brânquia.

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

4.5.2. Determinação da densidade e área fracional das CRMs e CMs

Amostras de brânquia fixadas em glutaraldeído a 2,5% em 0,1 M de tampão fosfato de pH 7,3 foram lavadas com o mesmo tampão, em seguida foi adicionado 16% de glicerol e foram submetidas a ultrassom para remoção do muco em seguida foram seriadamente desidratados em acetona até acetona absoluta, e em seguidas foram secas em aparelho de ponto crítico (Leica EM CPD030). Após secarem foram coladas em um suporte de alumínio, revestida com ouro (99%, Degusa, Brasil) em FCD Sputtering 004 (Bauser, Alemanha) e observadas utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV FEI Quanta 250). As imagens digitais foram usadas para analisar a superfície celular branquial. A área da superfície apical da CRM (AFCRM) e CM (AFCM) e a densidade de CRM (CRMden) e CM (CMden) em contato com o meio externo foi determinada utilizando imagens digitais da superfície epitelial aproximadamente na base da lamela na região interior do filamento ampliada 8000 x (10 campos não contínuos/filamento/amostra). A superfície apical das CRMs e CMs foi determinada pelo traçado dos perímetros apicais de todas as CRMs (célula inteira e parte da célula) de uma imagem digital por computador de triagem calibrado utilizando o software Image-pro Plus 6.0, como descrito por BINDON et al., (1994):

$$\text{AFCRM} = \Sigma \text{CRM apical área/área da imagem digital} \quad \text{Eq. 11}$$

$$\text{CRMden} = \text{AFCRM/média da área apical das CRM} \quad \text{Eq. 12}$$

$$\text{AFCM} = \Sigma \text{CMapical área/área da imagem digital} \quad \text{Eq. 13}$$

$$\text{CMden} = \text{AFCM/média da área apical das CM} \quad \text{Eq. 14}$$

A AFCRM e o AFCM foram apresentadas em porcentagem (%) da área de superfície do filamento e os dados de CRMden e CMden foram apresentados em número de CRM/mm² e número de CM/mm². Os valores médios para cada peixe foram calculados e estes valores foram utilizados para determinar a média de cada condição experimental.

4.6. Tratamento estatístico

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Para cada parâmetro analisado foi feita uma análise de variância de duas vias (ANOVA two way) sendo um fator a variação de salinidade e o segundo fator a concentração de atrazina. Em seguida foi realizado o teste *a posteriori* de Holm-Sidak (paramétrico) para os dados que passaram no teste de normalidade e homogeneidade de variância de Kolmogorov-Smirnov. Para os dados que não passaram nos pressupostos de normalidade e variância (IAH) foi utilizado o teste de Kruskal Wallis (não paramétrico) a fim de comparar as diferentes salinidades de aclimação no grupo controle e os diferentes tratamentos de atrazina em relação ao controle na mesma salinidade de aclimação. O nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$). Para a análise estatística dos dados utilizou-se o software Sigma Stat V3.5 para as análises paramétricas e o software STATISTICA versão 7.0 (StatSoft, EUA) para as análises não-paramétricas.

5. RESULTADOS

5.1. Mortalidade

Não houve mortalidade ao longo de todos os experimentos.

5.2. pH da água

O pH da água teve uma diminuição conforme a salinidade foi diminuindo (Tabela 2). Nos diferentes tratamentos com atrazina na mesma salinidade o pH da água não teve variações significativas (Tabela 2).

Tabela 2. Variação do pH da água nos diferentes tratamentos

Tratamento	Salinidade 25		Salinidade 16		Salinidade 8		Salinidade 0	
	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.	Média	D.P.
C	8,05	0,212	7,725	0,035	7,475	0,106	6,95	0,212
C Solv	7,85	0,211	7,815	0,035	7,575	0,106	6,7	0,070
2 µg/L	7,9	0,144	7,85	0,070	7,525	0,035	6,85	0,070
10 µg/L	8	0,145	7,81	0,056	7,485	0,077	6,885	0,120
100 µg/L	7,85	0,213	7,865	0,091	7,505	0,134	6,815	0,035

5.3. Enzimas de regulação iônica

A NKA apresentou um aumento da atividade conforme a aclimação em águas menos salinas tendo sua maior atividade expressa na água doce (Figura 12). Nos grupos expostos a atrazina houve uma inibição da NKA em relação ao controle de todos os grupos expostos a atrazina nos grupos aclimatados a AS-16 e AS-8. Já nos animais aclimatados a AM e a AD houve um aumento da atividade da NKA comparado ao controle em todos os grupos expostos a atrazina (Figura 12).

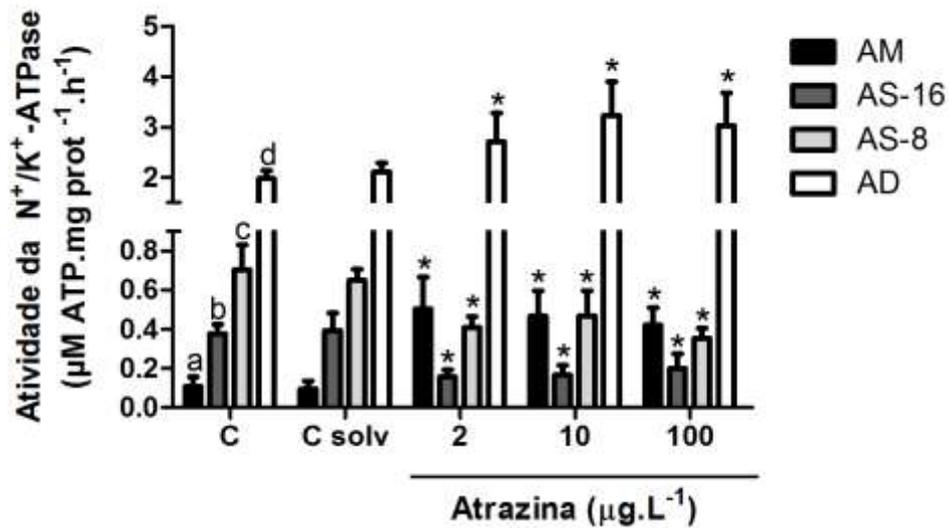


Figura 12. Atividade da Na^+/K^+ ATPase ($\mu\text{M ATP.mg prot}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

A V-HA aumentou a atividade nos animais aclimatados a AD (Figura 13). Nos grupos expostos a atrazina houve um aumento da atividade da V-HA em relação ao controle em todas as concentrações de exposição a atrazina e nas diferentes salinidades de aclimação com exceção do grupo exposto a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ aclimatados a AS-8 (Figura 13).

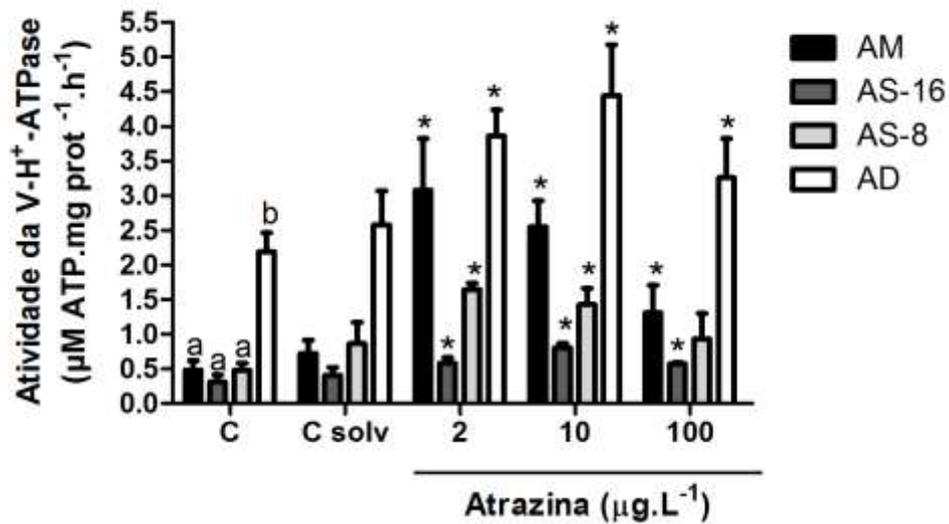


Figura 13. Atividade da V-H⁺-ATPase ($\mu\text{M ATP.mg prot}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

A AC diminuiu a atividade nos animais aclimatados a AD (Figura 14). Nos grupos expostos a atrazina houve uma inibição da atividade da AC em relação ao controle em todos os animais expostos a atrazina nos grupos aclimatados as AM, AS-16 AS-8. No grupo aclimatados a AD e exposto a atrazina, a AC foi inibida em relação ao controle somente nos animais exposto a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 14).

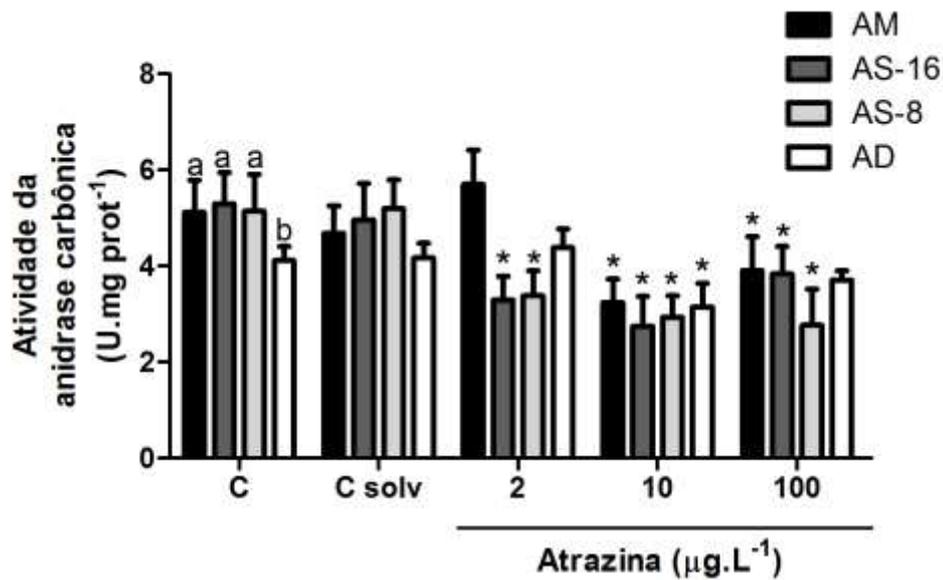


Figura 14. Atividade da anidrase carbônica (U.mg prot⁻¹) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

5.4. Células ricas em mitocôndria (CRMs)

As CRMs aumentaram a densidade e a área fracional quando os animais foram aclimatados a AD (Figuras 15, 16 e 17). Nos grupos expostos a atrazina, de maneira geral, a atrazina diminuiu a densidade de CRM assim como a área fracional nas diferentes salinidades de aclimações quando comparado com o respectivo controle (Figura 15).

A AFCRM dos animais aclimatados a AM diminuiu nos animais expostos a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ comparado com o controle (Figura 15 e 18). Nos animais aclimatados a AS-16 a diminuição da AFCRM em relação ao grupo controles ocorreu nos 3 grupos de exposição a atrazina (Figura 15 e 19). Animais aclimatados a AS-8 a diminuição da AFCRM em relação ao controle ocorreu apenas no grupo exposto a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 15 e 20) enquanto que nos animais aclimatados a AD, a AFCRM diminuiu nos animais expostos a 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 15 e 21).

A densidade de CRM nos animais aclimatados a AM foi menor em relação ao controle nos grupos de animais expostos as três diferentes concentrações de

atrazina (Figura 16 e 18). Nos animais aclimatados a AS-16, a CRMden foi menor em relação ao controle somente nos grupos de animais expostos a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 16 e 19). Nos animais aclimatados a AS-8, a CRMden foi menor somente nos animais expostos a concentração mais baixa de atrazina ($2 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Figura 16 e 20). Já os animais aclimatados a AD, a CRMden apresentaram um perfil de diminuição dose depende, ocorrendo a menor diminuição da densidade no grupo exposto a maior concentração de atrazina ($100 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Figura 16 e 21).

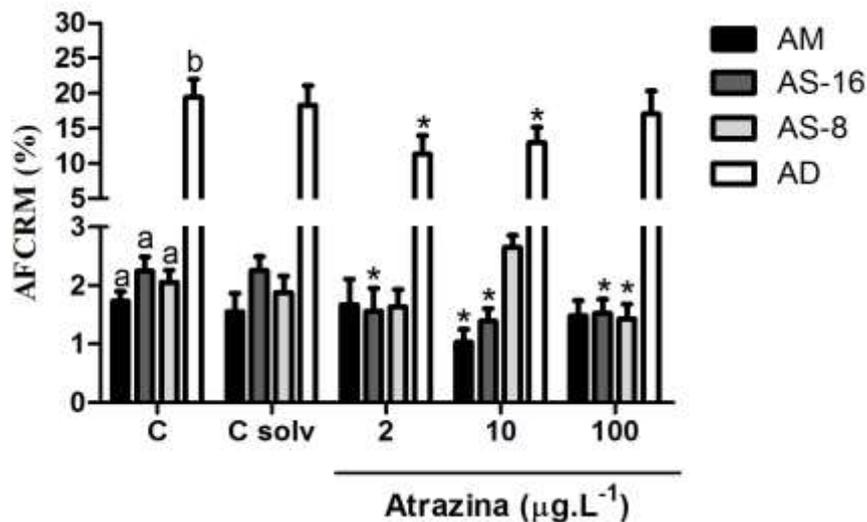


Figura 15. Área fracional das células ricas em mitocôndria (AFCRM) (%) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

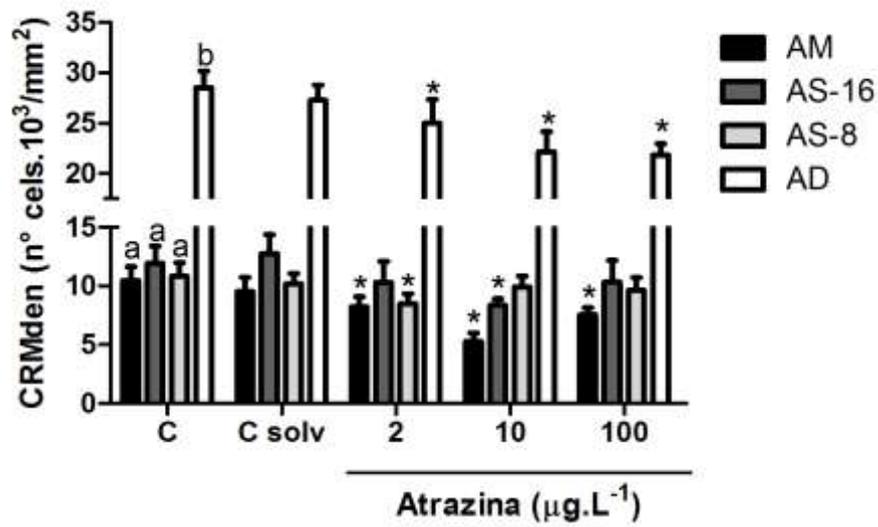


Figura 16. Densidade das células ricas em mitocôndria (CRMden) (n° células/mm²) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

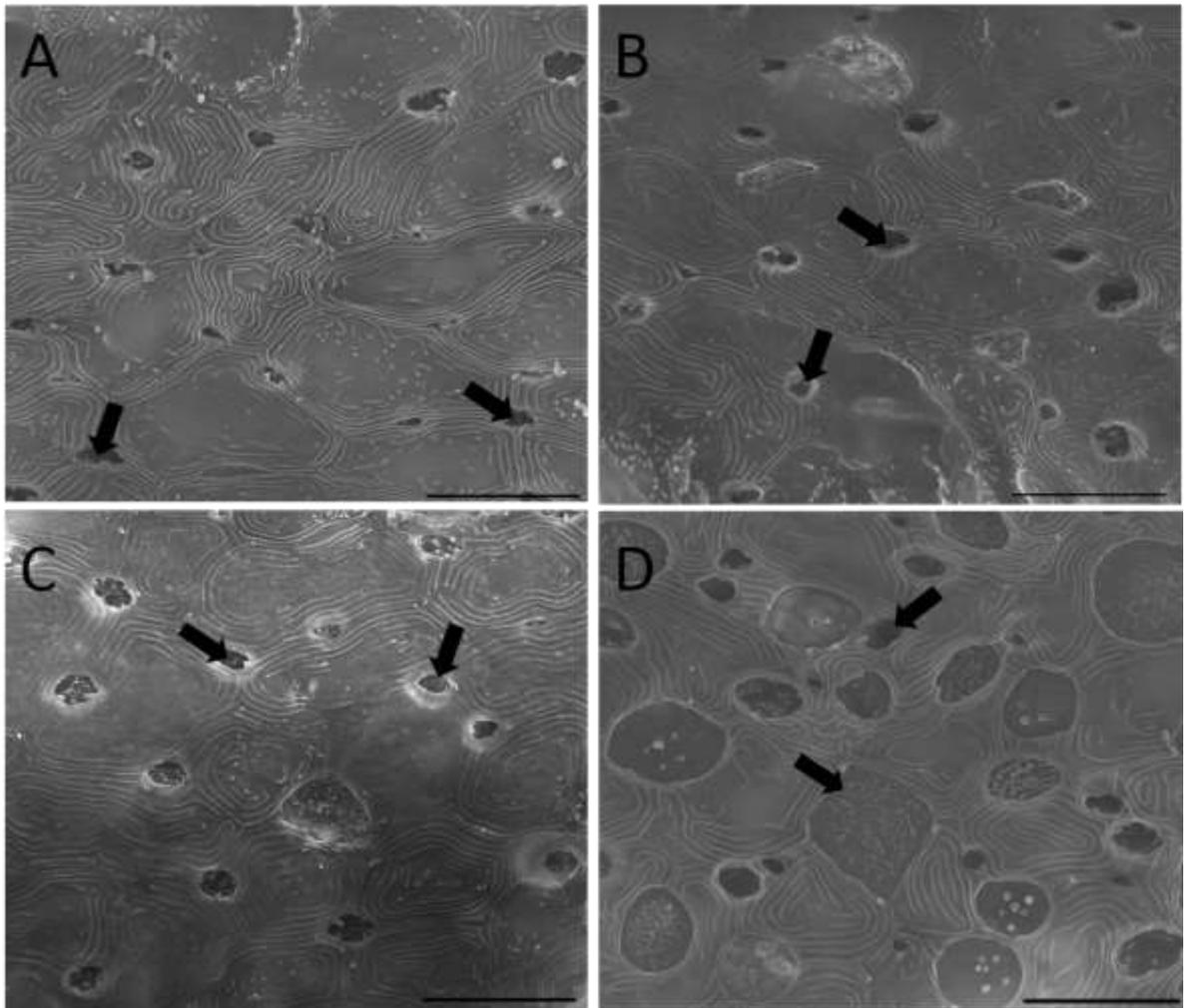


Figura 17. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferente salinidades. (A) animais aclimatados a salinidade 24 (AM). (B) animais aclimatados a salinidade 16 (AS-16). (C) animais aclimatados a salinidade 8 (AS-8). (D) animais aclimatados a água doce (AD). Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm .

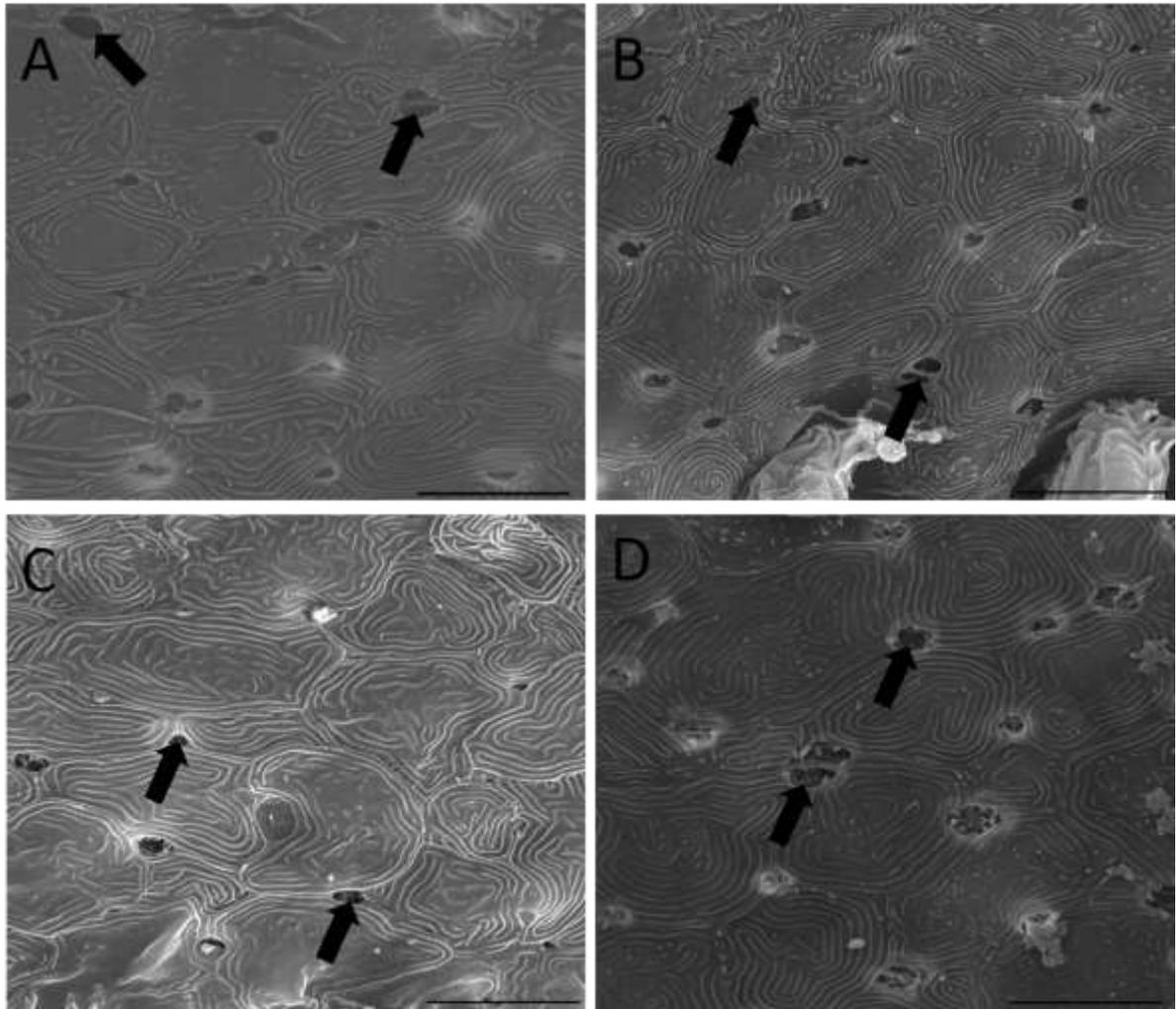


Figura 18. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 24 (AM) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μm .

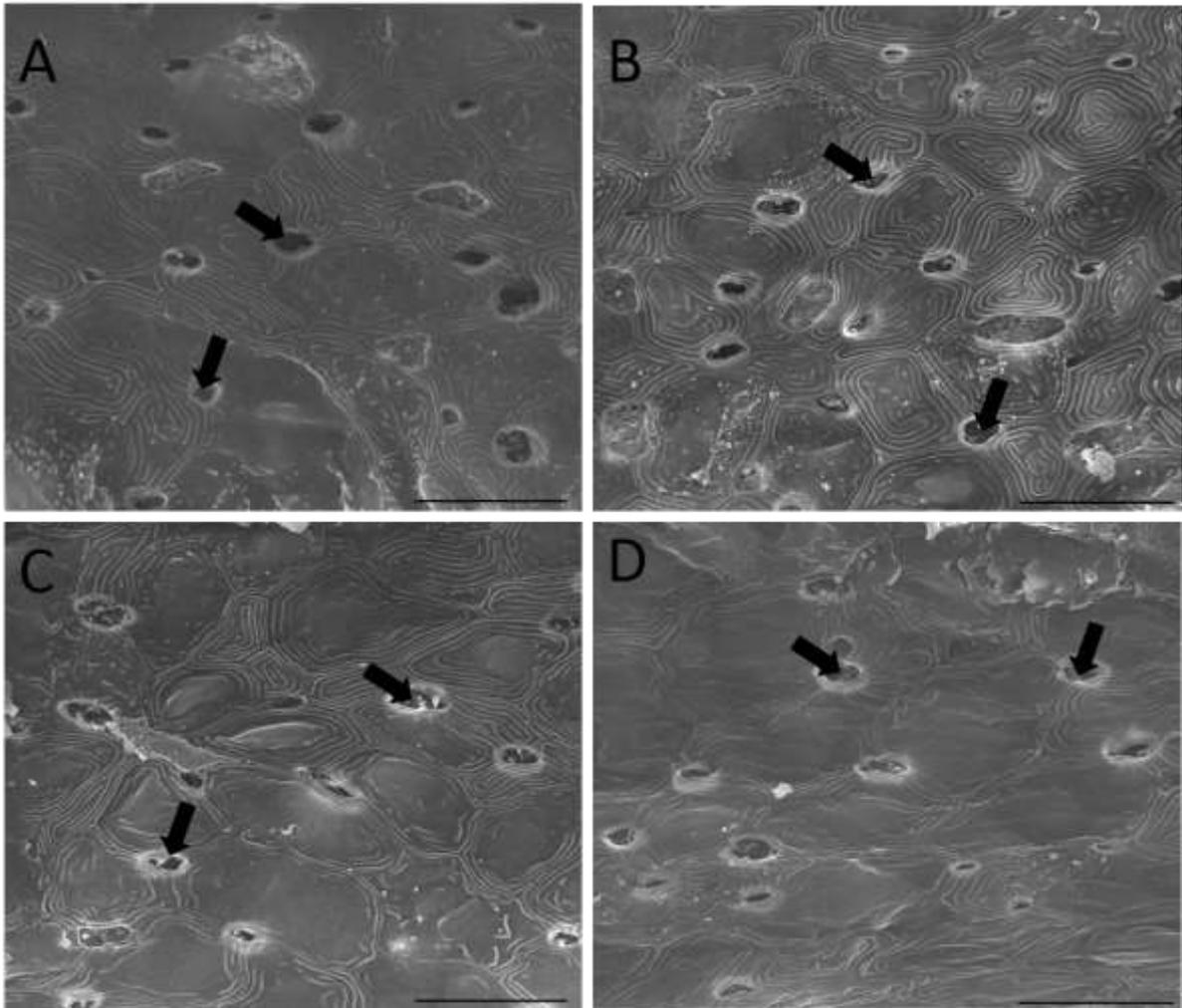


Figura 19. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 16 (AS-16) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

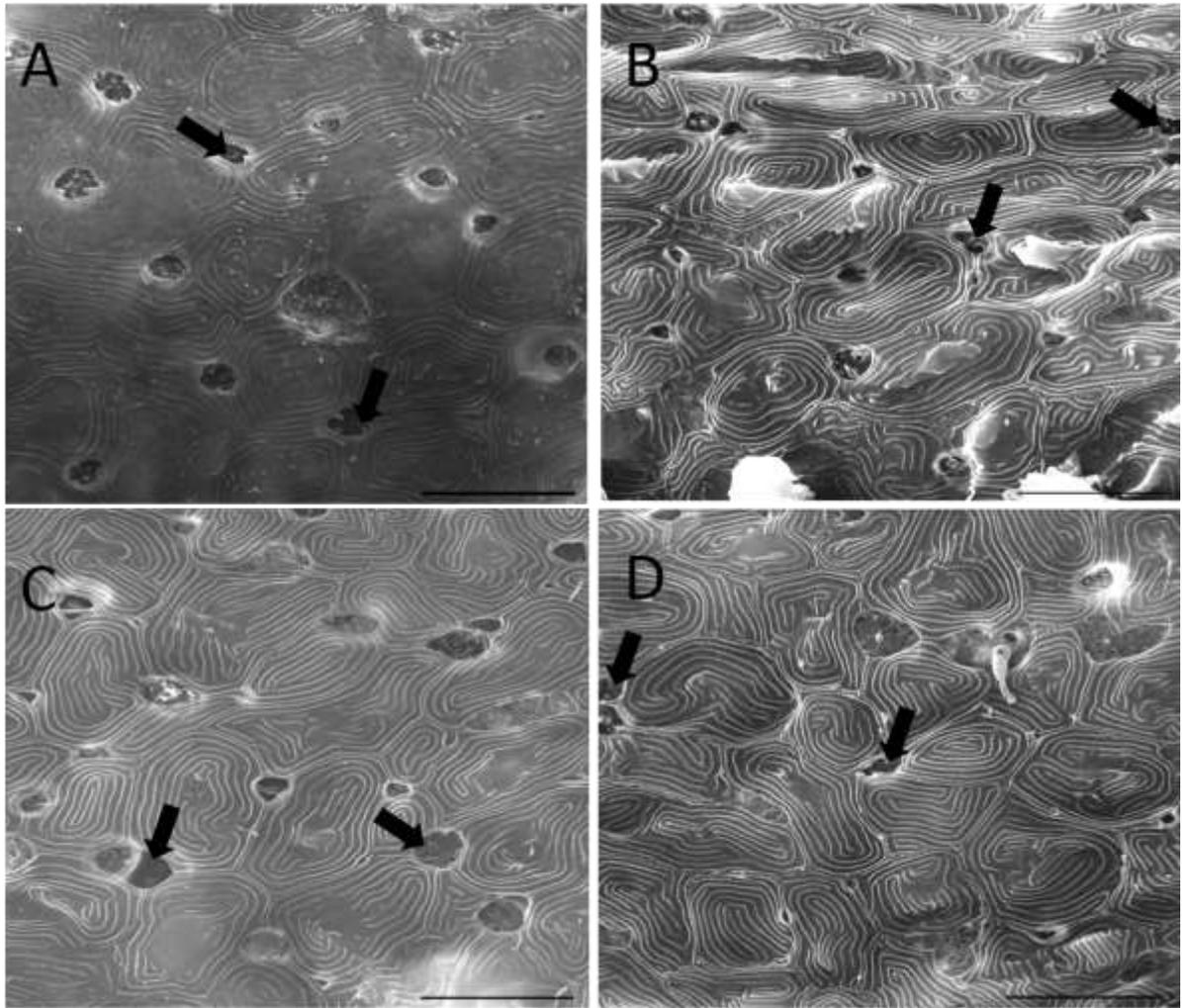


Figura 20. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 8 (AS-8) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

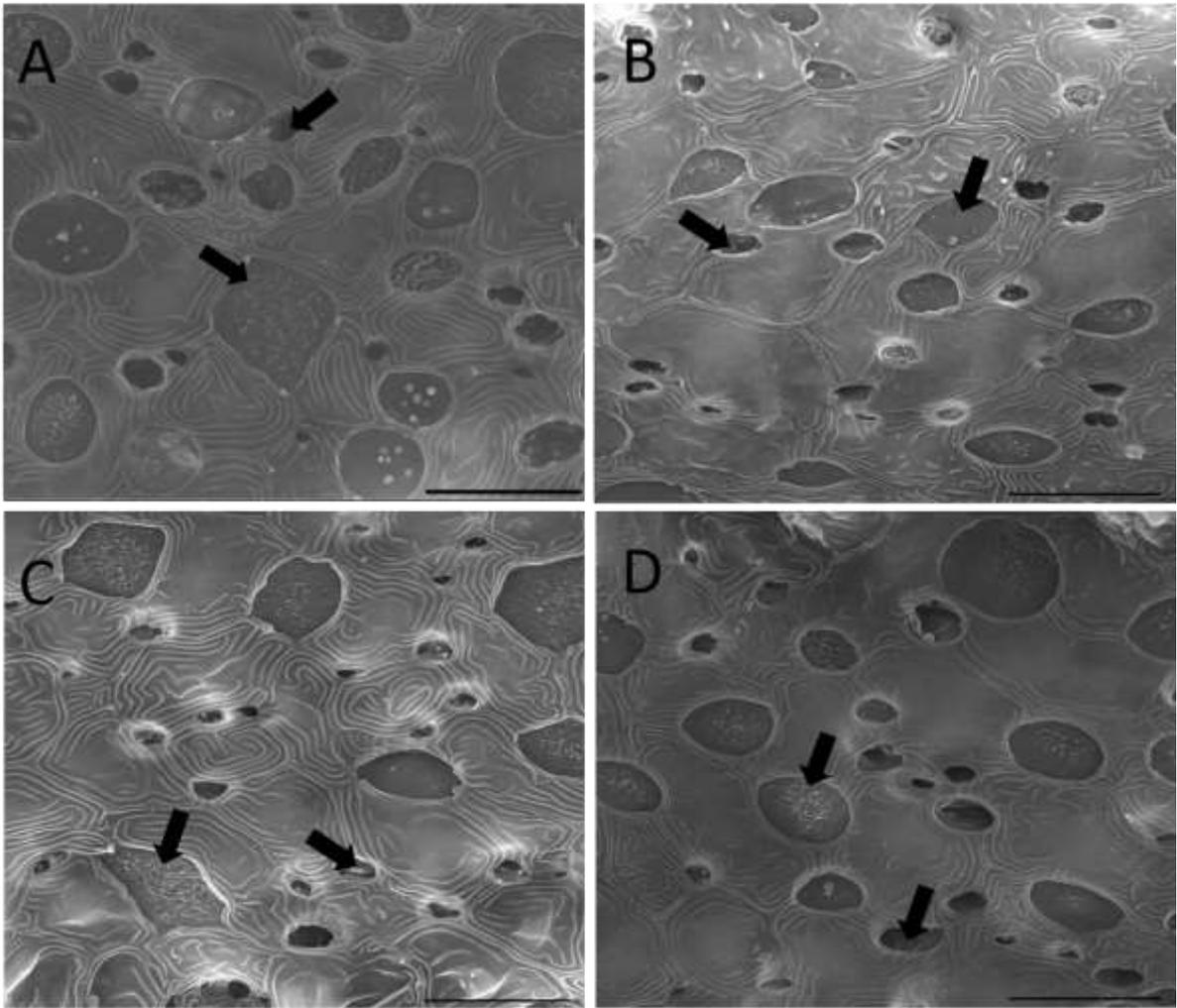


Figura 21. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a água doce (AD) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CRMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

5.5. Estresse oxidativo

A ACAP foi mais alta nos animais aclimatados a AS-16 e foi diminuindo conforme a diminuição da salinidade, sendo que os animais aclimatados a AD possui um ACAP igual aos aclimatados a AM (Figura 22).

A atrazina apresentou um efeito diferente conforme a aclimação que animal passou. Animais aclimatados a AM quando expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ aumentou a ACAP, mas esse aumento não foi observado nos grupos expostos a concentrações mais elevadas (Figura 22). Animais aclimatados a AS-16 apresentaram uma diminuição da ACAP com um perfil dose-dependente atingindo o menor valor no grupo de animais exposto a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 22). Os animais aclimatados a AS-8 apresentaram uma diminuição da ACAP nos grupos expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ e níveis iguais ao controle no grupos exposto a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 22). Já os animais aclimatados a AD não apresentaram diferenças em relação o grupo controle e os grupos expostos a atrazina (Figura 22).

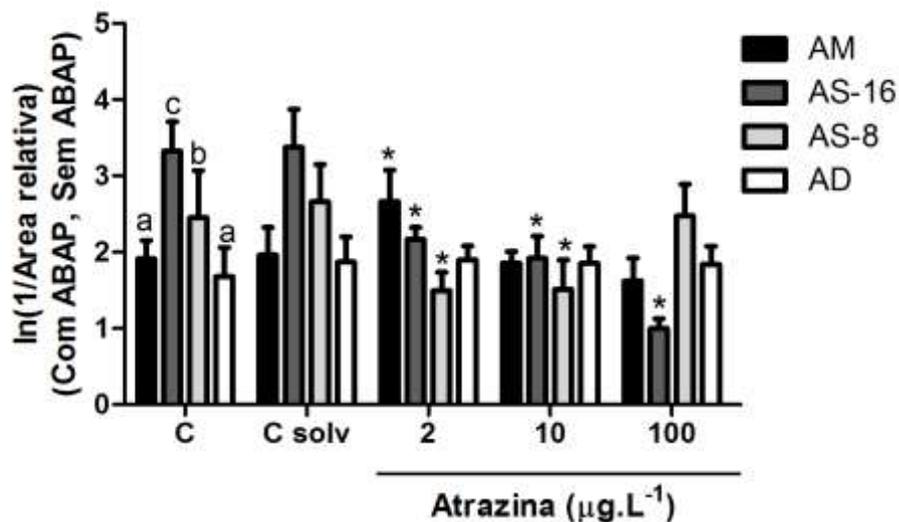


Figura 22. Capacidade antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) ($\ln(1/\text{área relativa})$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

A GST teve um aumento de atividade quando o animal foi aclimatado em água menos salinas (Figura 23). Nos grupos aclimatados as maiores salinidades

(AM e AS-16) a atrazina de maneira geral diminuiu a atividade da GST, sendo que nos animais aclimatados a AM essa diminuição ocorreu nos animais expostos a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e nos animais aclimatados a AS-16 essa diminuição só ocorreu nos animais expostos a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 23).

Entretanto nos animais aclimatados as menores salinidades (AS-8 e AD) a atrazina de maneira geral aumentou a atividade da GST, sendo que nos animais aclimatados a AS-8 esse aumento ocorreu nas três diferentes concentrações de exposição e nos animais aclimatados a AD esse aumento só foi observado no grupo de animais expostos a 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 23).

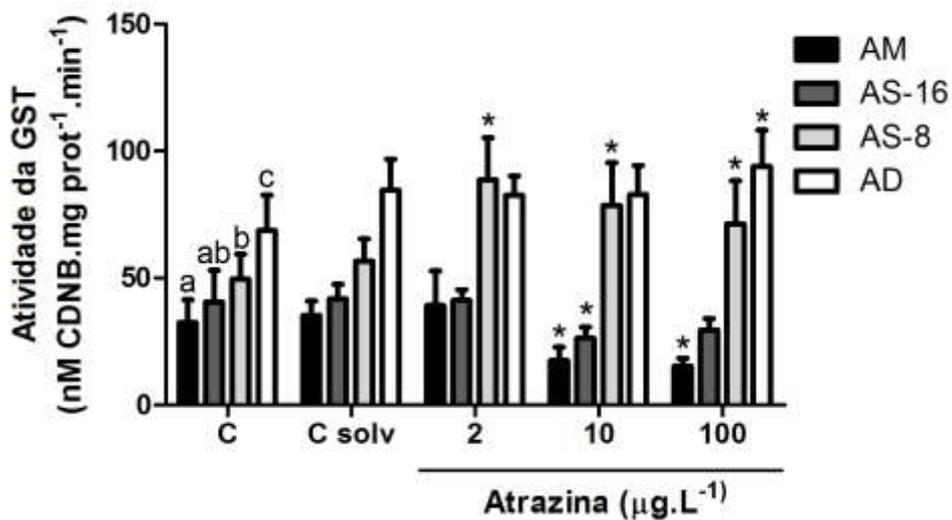


Figura 23. Atividade da glutiona-s-transferase ($\text{nM CDNB.mg prot}^{-1}.\text{mim}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

A concentração de LPO foi menor nos animais aclimatados a AM e a AS-8 tendo um aumento nos animais aclimatados a AS-16. (Figura 24).

Nos grupos aclimatados a AM e AS-16 não houve alteração dos níveis de LPO após exposição a atrazina quando comparado com o respectivo controle (Figura 24). Entretanto nos animais aclimatados a AS-8 e AD, a exposição a atrazina aumentou os níveis de LPO quando comparado com o controle, sendo que nos animais aclimatados a AS-8 esse aumento ocorreu nos grupos de animais expostos a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e nos animais aclimatados a AD esse aumento foi observado nos três grupo de animais expostos a atrazina (Figura 24).

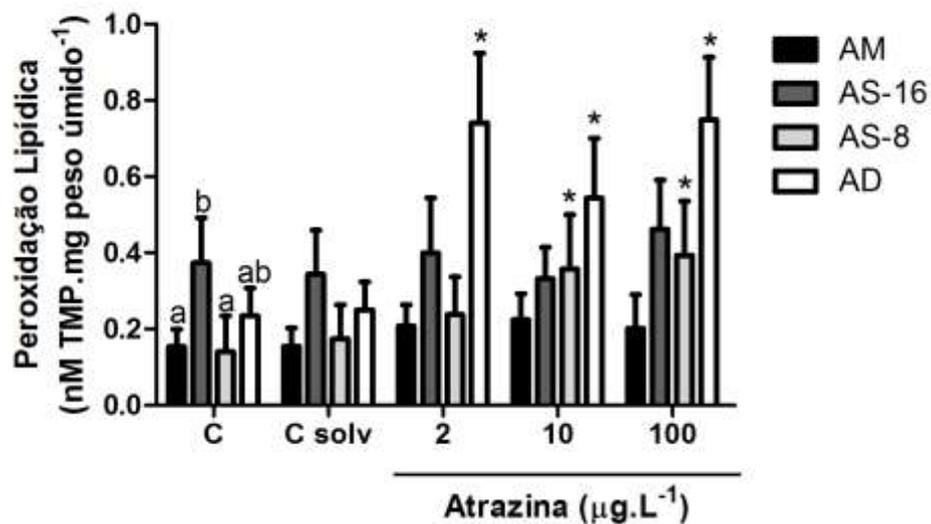


Figura 24. Peroxidação lipídica (LPO) ($\text{nM TMP.mg peso úmido}^{-1}$) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

5.6. Histopatologia de brânquias

A estrutura normal do epitélio lamelar de *P. vivipara* está representada pela figura 26 A, onde se nota uma fina camada de revestimento formada pelas células pavimentosas (CPVs). As principais patologias encontradas em brânquias de *P. vivipara* estão apresentadas na figura 26 de B a I. As patologias encontradas foram hipertrofia do epitélio lamelar, hiperplasia do epitélio lamelar, descolamento epitelial,

proliferação de células mucosas, proliferação de CRM, constrição do sistema de células pilares, congestão vascular, dilatação do sistema de células pilares, fusão lamelar e aneurisma (Tabela 3, 4, 5 e 6).

A frequência de lesões não difere muito entre as salinidades e os grupos expostos a atrazina, o mais marcante é o aumento na frequência de hipertrofia do epitélio lamelar nos animais aclimatados a AM e expostos a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$. As alterações histopatológicas mais encontradas em todos os grupos são classificadas como estágio I

O IAH não apresentou diferenças em nenhum grupo aclimatado a diferentes águas assim como não apresentou diferenças nos animais expostos à atrazina em relação ao controle e o valor do IAH ficou abaixo de 10 indicando danos leves que não prejudicam o funcionamento do órgão.

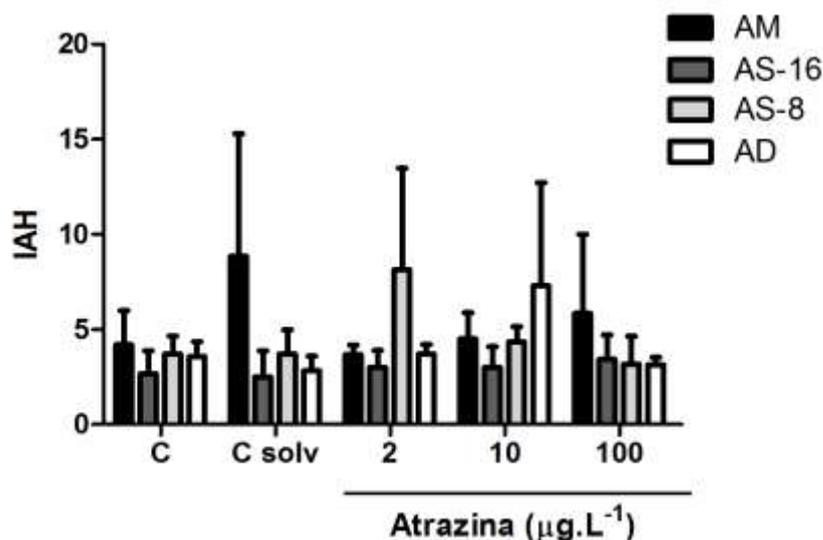


Figura 25. Índice de alterações histopatológicas (IAH) em brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

Tabela 3. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatadas a salinidade 24 (AM) e expostas a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas.

Alteração	Estágio	Atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				
		C	C solv	2	10	100
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	+	++	+++	+++
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0+	0+	0+	0+	0+
Descolamento epitelial	I	0+	0+	0+	0+	0+
Dilatação do sistema de células pilares	I	+	++	+	+	+
Constricção do sistema de células pilares	I	0+	0	0+	0+	0
Proliferação de células ricas em mitocôndria	I	0+	0+	0	0+	0+
Proliferação de células mucosas	I	+	+	++	++	+
Congestão vascular	I	0+	0+	0+	0+	+
Fusão das lamelas	II	0+	0	0	0	0+
Aneurisma	II	0	0+	0	0	0+

0 = ausente; 0+ = presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente

Tabela 4. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a salinidade 16 (AS-16) e expostos a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas.

Alteração	Estágio	Atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				
		C	C solv	2	10	100
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	0+	+	+	+
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0+	0+	0+	0	0
Descolamento epitelial	I	0+	0+	0+	0+	+
Dilatação do sistema de células pilares	I	0	0+	0	0+	0+
Constricção do sistema de células pilares	I	0	0+	0	0	0+
Proliferação de células ricas em mitocôndria	I	0+	0+	0+	0+	0+
Proliferação de células mucosas	I	0+	0+	0	0+	0+
Congestão vascular	I	0	0	0	0	0
Aneurisma	II	0	0	0	0	0

0 = ausente; 0+ = presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente

Tabela 5. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a salinidade 8 (AS-8) e expostos a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas.

Alteração	Estágio	Atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				
		C	C solv	2	10	100
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	++	+	+	+
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0+	0+	0+	0	0+
Descolamento epitelial	I	0+	0+	0+	0+	0+
Dilatação do sistema de células pilares	I	0+	0+	0+	+	0
Constricção do sistema de células pilares	I	0+	0+	0+	0+	0+
Proliferação de células ricas em mitocôndria	I	0+	0+	0+	0+	+
Proliferação de células mucosas	I	0+	+	0+	+	0+
Congestão vascular	I	0+	0	0+	0+	0
Aneurisma	II	0	0	0+	0	0

0 = ausente; 0+ = presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

Tabela 6. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a água doce (AD) e expostos a atrazina em diferentes concentrações por 96 horas.

Alteração	Estágio	Atrazina ($\mu\text{g.L}^{-1}$)				
		C	C solv	2	10	100
Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	+	+	++	+
Hiperplasia do epitélio lamelar	I	0+	0	0+	0+	0+
Descolamento epitelial	I	0+	0+	+	+	0+
Dilatação do sistema de células pilares	I	0+	0+	0+	0	0+
Constricção do sistema de células pilares	I	0+	0	0+	0+	0+
Proliferação de células ricas em mitocôndria	I	0+	0+	++	+	+
Proliferação de células mucosas	I	0+	0+	0+	0+	0+
Congestão vascular	I	0	0+	0	0	0
Aneurisma	II	0	0	0	0+	0

0 = ausente; 0+ = presente; + = pouco frequente; ++ = frequente; +++ = muito frequente.

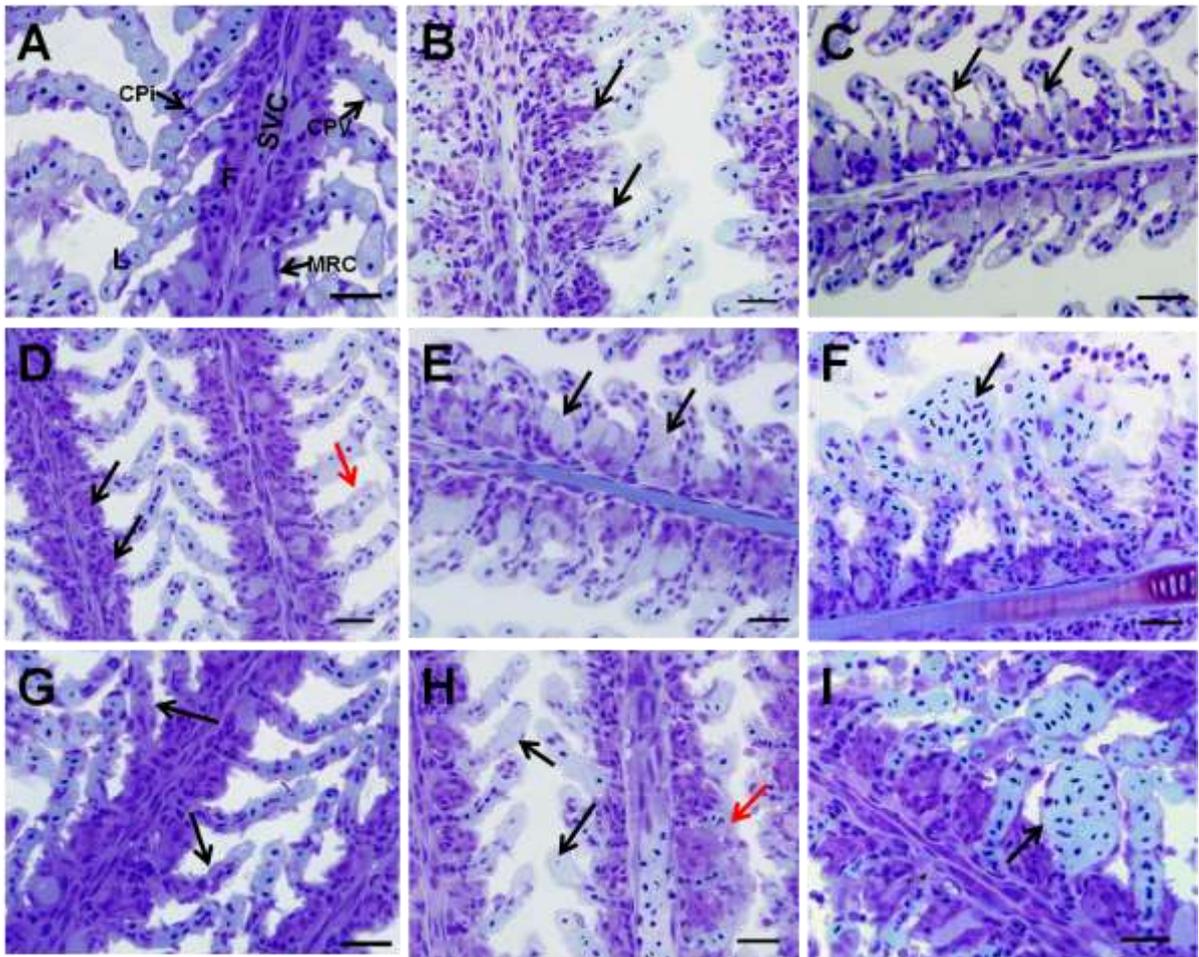


Figura 26. Fotomicrografia ilustrando as histopatologias mais encontradas em brânquias de *P. vivipara* aclimatados a diferentes águas e expostos a diferentes concentrações de atrazina. (A) Estrutura branquial normal indicando suas respectivas estruturas. (B) Hiperplasia do epitélio lamelar (setas). (C) Descolamento epitelial (setas). (D) Proliferação de células mucosas (setas pretas); hipertrofia do epitélio lamelas (setas vermelhas). (E) Proliferação de células ricas em mitocôndrias (setas). (F) Congestão vascular (setas). (G) Contração do sistema de células pilares (setas). (H) Dilatação do sistema de células pilares (setas pretas); fusão lamelas (setas vermelhas). (I) Aneurisma (seta). CPi = células pilares; CPV = células pavimentosas; CRM = célula rica em mitocôndria; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 μ m.

5.7. Células mucosas

A área fracional das células mucosas foi maior nos animais aclimatados a AS-8 e menor nos animais aclimatados a AD (Figura 27 e 29). A densidade de CM foi maior nos animais aclimatados a AM, diminuiu no grupo AS-16, aumentou no grupo AS-8 e diminuiu nos animais aclimatados a AD (Figura 28 e 29).

A atrazina apresentou efeitos diferentes para cada salinidade aclimação tanto para a área fracional como para a densidade de CMs. A atrazina diminuiu a

AFCM nos animais aclimatados a AM e expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 27 e 30). Os animais aclimatados a AS-16 e AS-8 expostos a atrazina não apresentaram diferenças quando comparado com seu respectivo controle (Figura 27, 31 e 32) entretanto, os animais aclimatados a AD tiveram um aumento da área fracional das CMs quando exposto a atrazina (Figura 27 e 33).

A densidade das CMs dos animais aclimatados a AM diminuiu quando o animal está exposto a $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ atrazina (Figura 28 e 30). Nos animais aclimatados a AS-16 e a AS-8 a atrazina não alterou a densidade quando comparado com os seus respectivos controles (Figura 28, 31 e 32). Já nos animais aclimatados a AD observou-se um aumento na densidade em relação ao controle nos grupos expostos a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$.

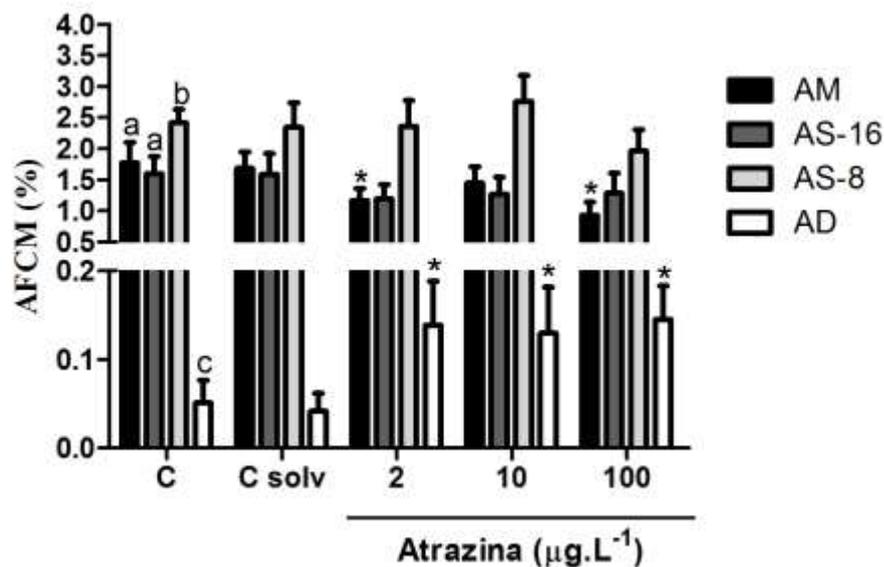


Figura 27. Área fracional das células mucosas (AFCM) (%) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

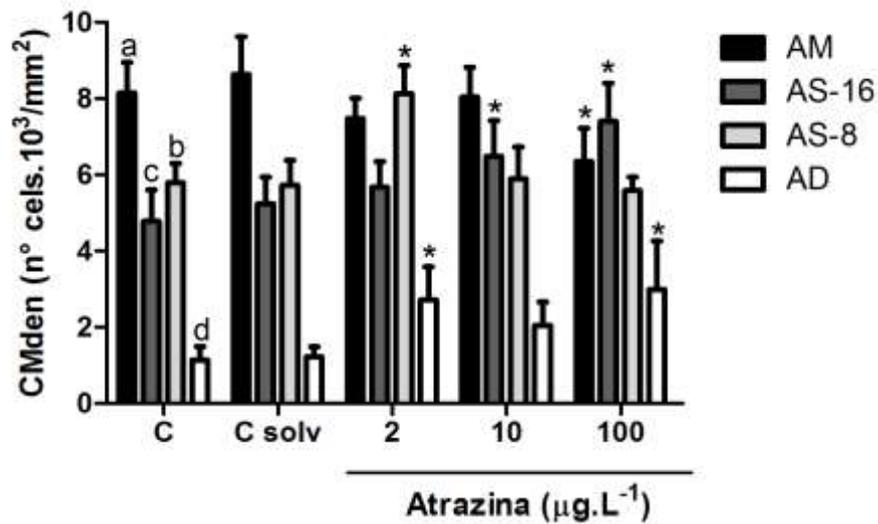


Figura 28. Densidade das células mucosas (CMden) (n° células/mm²) de brânquias de *P. vivipara*. AM = Animais aclimatados a salinidade 24; AS-16 = Animais aclimatados a salinidade 16; AS-8 = animais aclimatados a salinidade 8 e AD = animais aclimatados a água doce. Letras diferentes indicam diferença entre as diferentes aclimações do grupo controle ($P < 0,05$). Asterisco indica diferença em relação ao controle na mesma água de aclimação ($P < 0,05$). Dados apresentados em média \pm D.P. ($n=7$).

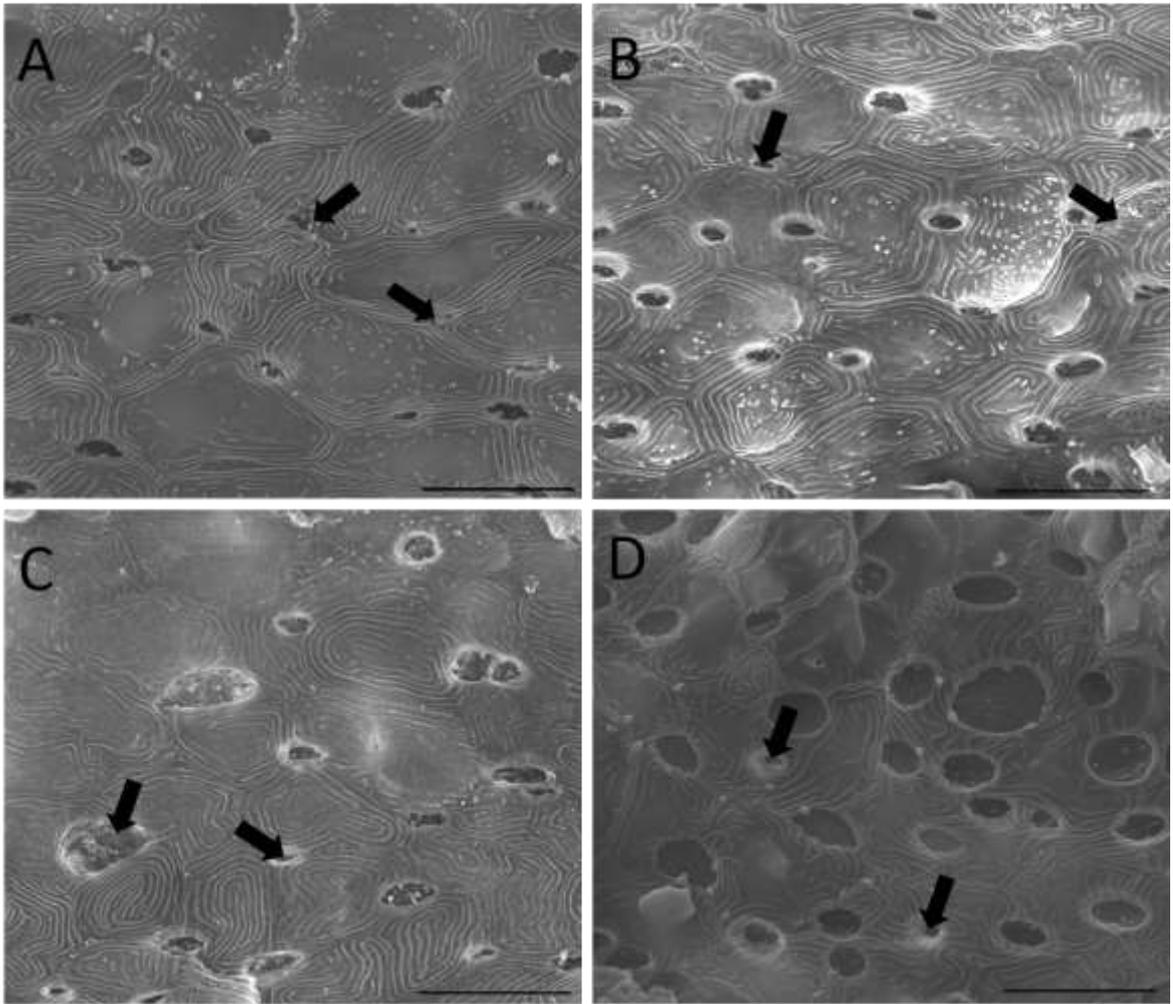


Figura 29. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a diferentes salinidades. (A) animais aclimatados a salinidade 24 (AM). (B) animais aclimatados a salinidade 16 (AS-16). (C) animais aclimatados a salinidade 8 (AS-8). (D) animais aclimatados a água doce (AD). Setas indicam as CMS, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = 10 μ m.

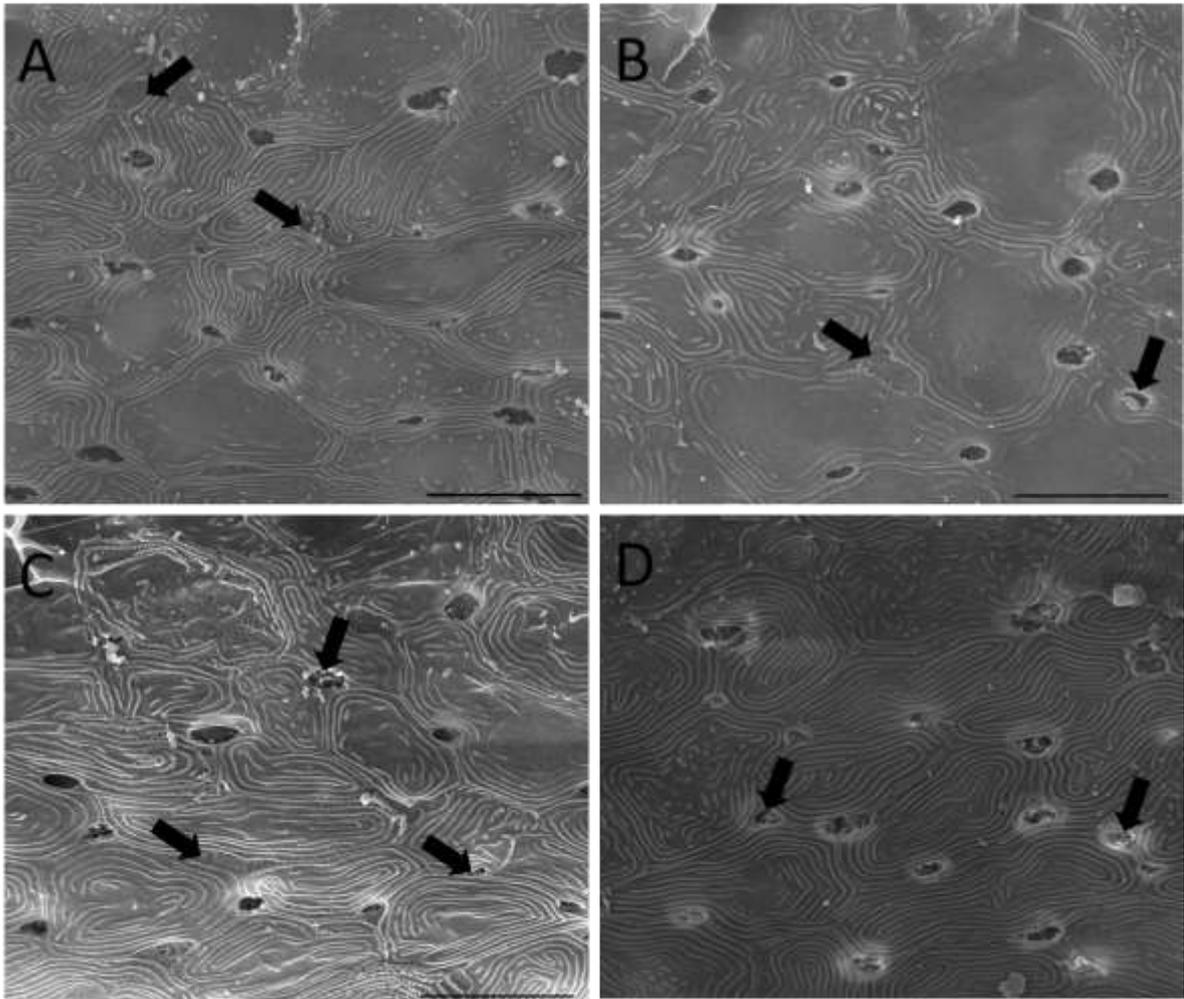


Figura 30. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 24 (AM) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

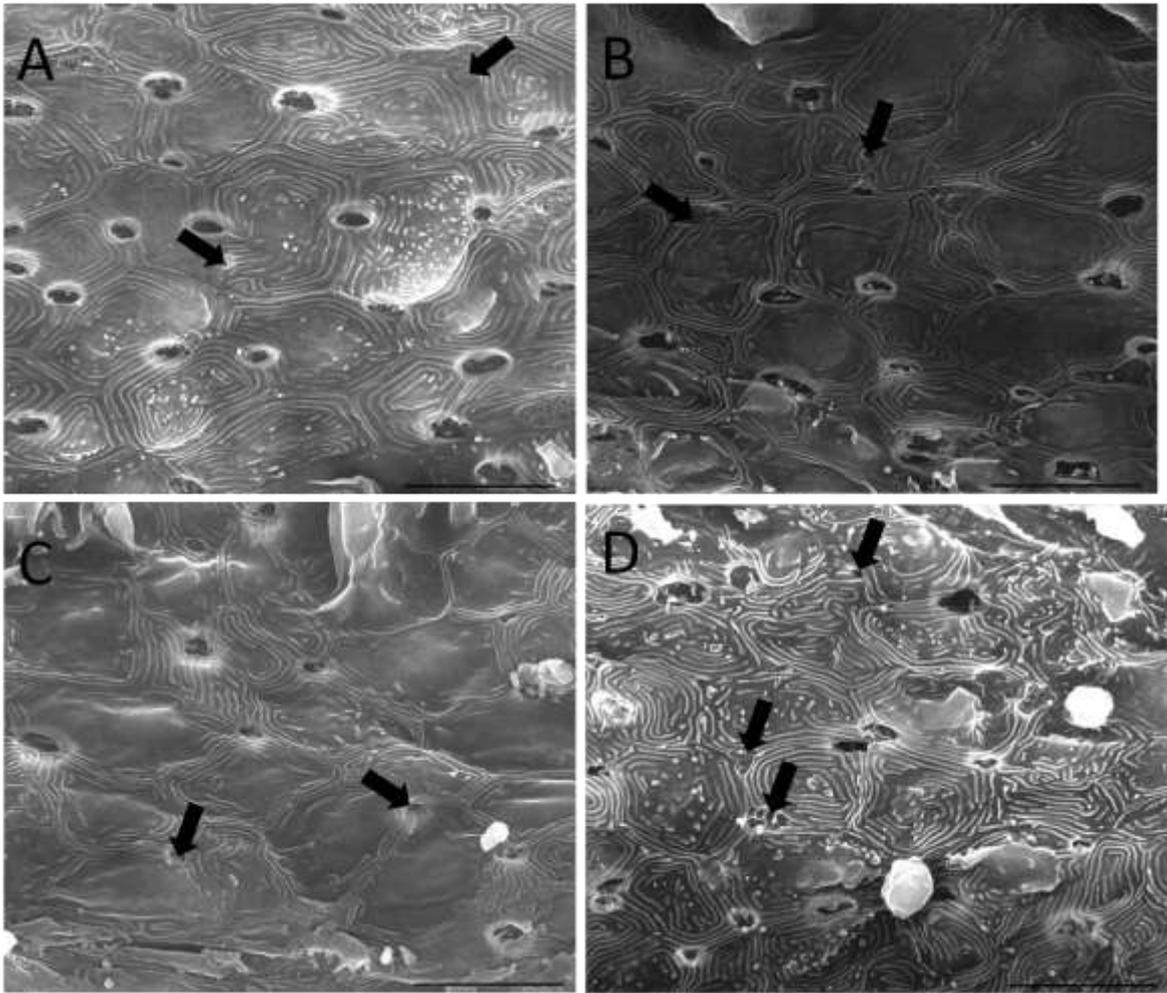


Figura 31. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 16 (AS-16) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

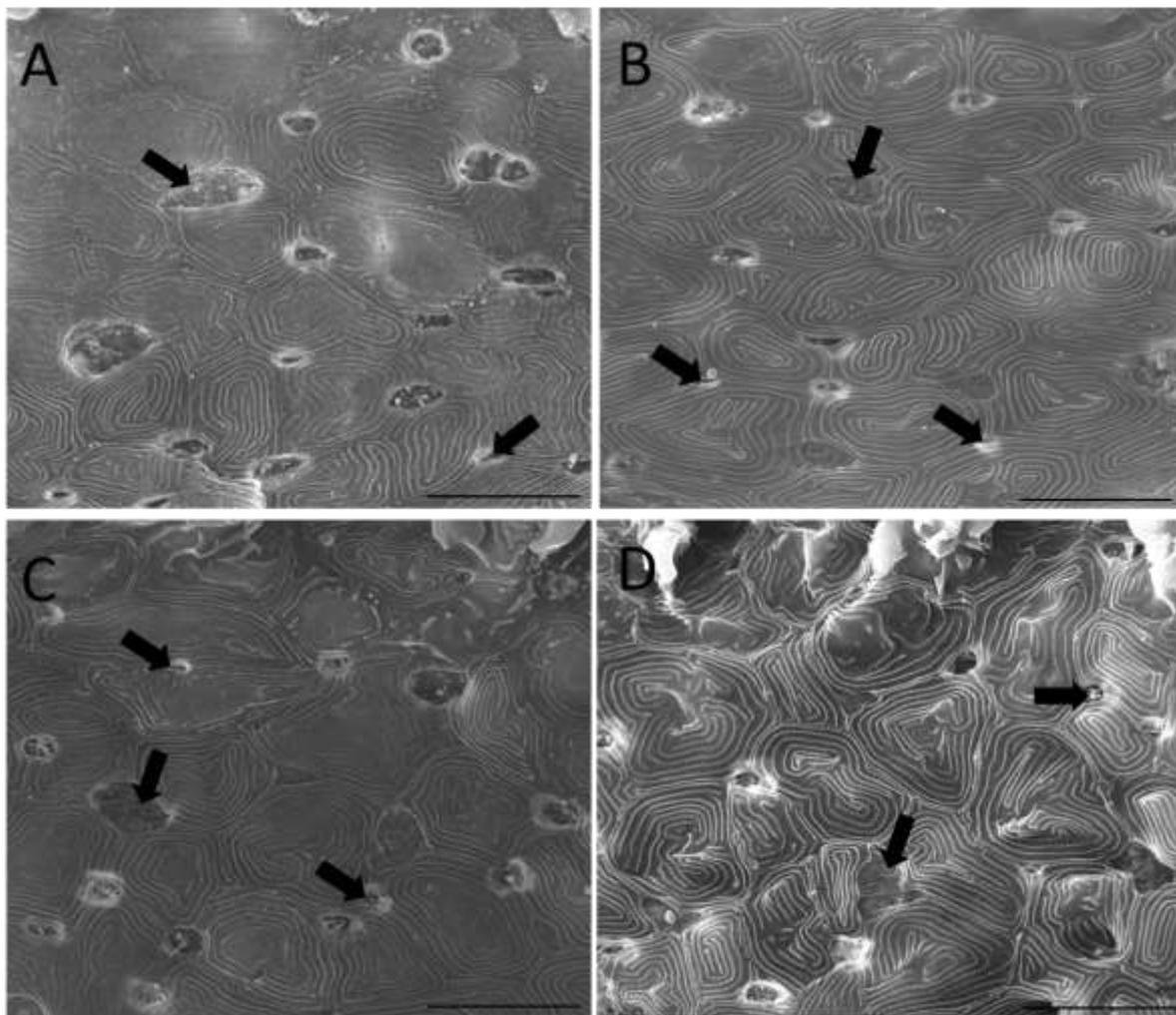


Figura 32. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a salinidade 8 (AS-8) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

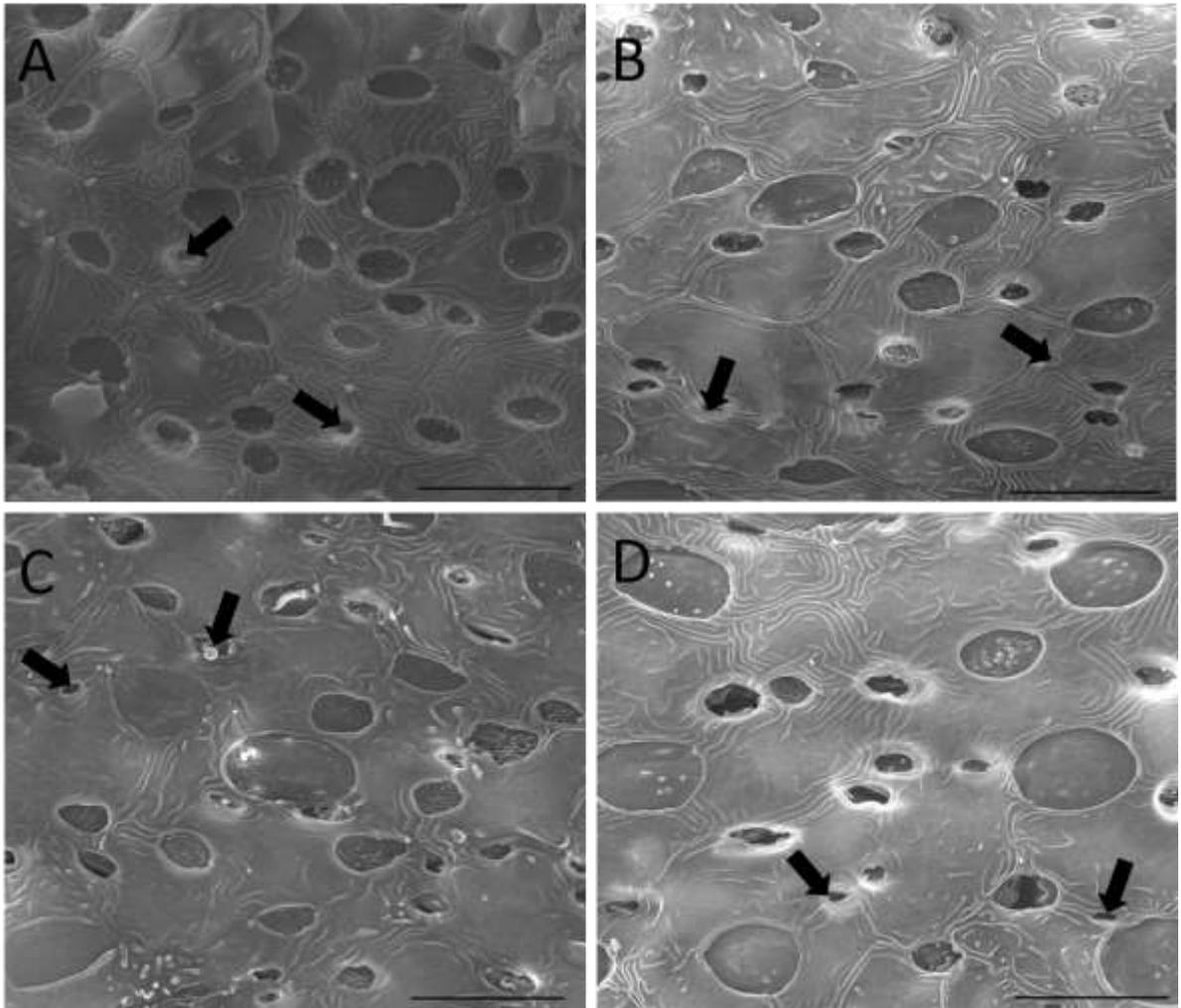


Figura 33. Fotomicrografia de microscopia eletrônica de varredura do epitélio branquial de *Poecilia vivipara* aclimatados a água doce (AD) e expostos a diferentes concentrações de atrazina durante 96 horas. (A) animais controle (não expostos a atrazina). (B) animais expostos as $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (C) animais expostos as $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. (D) animais expostos as $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina na água. Setas indicam as CMs, note as diferenças na densidade e morfologia da superfície apical. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

6. DISCUSSÃO

6.1. Aclimação a diferentes salinidades

A maioria dos teleósteos eurialinos exibe alterações fisiológicas e morfologias para se ajustarem as alterações da salinidade ambiente, o que implica em alterações nas CRMs e atividade das enzimas relacionadas a excreção e/ou absorção de ions (MARSHALL et al., 2002; EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007).

A NKA é responsável pelo transporte ativo de Na^+ e de K^+ em células animais e é importante não só para a manutenção da homeostase intracelular, mas também para proporcionar uma força motriz para muitos sistemas de transporte como nas brânquias dos peixes. Em geral, em teleósteos eurialinos, os níveis mais baixos de atividade da NKA têm sido encontrados geralmente em indivíduos aclimatados em ambientes cuja salinidade é semelhante aos seus habitats naturais (JENSEN et al., 1998; FENG et al., 2002; LIN, et al., 2006; HWANG; LEE, 2007; KANG; LIU, et al., 2012; KANG; YANG, et al., 2012). Os resultados deste estudo revelaram que a atividade da NKA branquial em *P. vivipara* aumentou com a diminuição da salinidade sendo que a atividade mais alta foi em animais aclimatados na água doce, o que corrobora com outros estudos cujos animais foram coletados em água do mar e aclimatados a água doce (BYSTRIANSKY; SCHULTE, 2011; KANG; LIU et al., 2012).

O aumento na atividade da V-HA em *P. vivipara* após aclimação em AD foram similares aos resultados obtidos por BYSTRIANSKY; SCHULTE, (2011) em *Salmo salar* coletados em AM e transferidos para AD. Teleósteos adaptados a AM geralmente apresentam uma baixa atividade da V-HA (principalmente para a excreção de ácido) (EVANS et al., 2005), entretanto quando aclimatado a AD a V-HA é um importante mecanismo na captação de Na^+ juntamente com a NKA. Além disso, V-HA tem um papel importante no controle ácido-base (PERRY et al., 2003; PARKS et al., 2007), uma vez que elimina o íon H^+ do interior da célula para o meio ambiente. O aumento da V-HA observado em *P. vivipara* pode estar relacionado não apenas a manutenção dos ajustes iônicos e osmorregulatórios, mas também ao equilíbrio ácido-base do organismo uma vez que a diminuição da salinidade geralmente está associada a diminuição do pH da água.

Estudos relataram a expressão e atividade da AC em peixes aclimatados a diferentes salinidades, entretanto as respostas dessa enzima quando o organismo é submetido a variação de salinidade é bastante variável (SCOTT et al., 2005; ZBANYSZEK; SMITH, 1984; MASHITER; MORGAN, 1975). Em *Fundulus heteroclitus* transferidos de água salobra (salinidade 10 ‰) para a água doce ocorreu um aumento da expressão da AC, 12 horas após a transferência (SCOTT et al., 2005). Nas brânquias de *Oncorhynchus kisutch* a atividade da CA foi significativamente maior nos peixes aclimatados em AM em comparação com peixes de água doce (ZBANYSZEK; SMITH, 1984), enquanto que *Platichthys flesus* não apresentaram diferenças significativas nos níveis de AC quando aclimatados em água salgada e em água doce (MASHITER; MORGAN, 1975).

A atividade mais alta da AC em *P. vivipara* aclimatada a AM e AS pode estar relacionado a eliminação de amônia e regulação ácido-base uma vez que a AC possui uma baixa atuação nos mecanismos de excreção de Na^+ e Cl^- (KULTZ et al., 1992). No epitélio branquial são encontradas diferentes isoformas de AC e novos modelos experimentais tem sido elaborados para entender melhor o papel da AC na excreção de CO_2 , regulação iônica e equilíbrio ácido-base (GILMOUR, 2012). No presente estudo, era esperado um aumento na atividade da AC branquial de *P. vivipara* aclimatados a AD uma vez que a hidratação do CO_2 por essa enzima é fonte de íons para os mecanismos de captação de Na^+ e Cl^- e que foi observado um aumento da atividade da NKA e da V-HA nesses animais. Entretanto ocorreu uma diminuição da atividade nos animais aclimatados a AD, que poderia ser explicado pela presença de diferentes isoformas que possuem funções específicas (Gilmour, 2012).

De forma geral, no presente estudo *P. vivipara* coletados em AM e transferido para AD mostraram diferenças significativas na atividade da NKA, V-HA e AC, entretanto ZIMMER et al., (2012) estudando *P. vivipara* coletadas em AD e transferidas para AM, não observaram diferenças significativas na atividade dessas enzimas o que poderia evidenciar diferenças no processo de aclimação dependendo das alterações de salinidade, AM para AD ou AD para AM.

A morfologia apical das CRMs em teleósteos adaptados a AD (CRM-AD) apresenta superfície plana com microvilosidades e de teleósteos adaptados em água marinha (CRM-AM) apresenta forma de cripta cripta, teleósteos adaptados a água salobra (AS) apresenta um morfologia apical das CRM igual a das CRM-AM

(PERRY, 1997; EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007; KANEKO et al., 2008; KANG; LIU, et al., 2012; KANG; YANG, et al., 2012). A morfologia das CRMs de *P. vivipara* aclimatados a AM, AS-16, AS-8 e AD possuem o mesmo fenótipo típico de CRMs de outros teleósteos aclimatados a situações de AM, AS e AD (CHANG et al., 2002; HOSSLER et al., 1985; KANG; LIU, et al., 2012; KANG; YANG, et al., 2012; KATOH; KANEKO, 2003; LEE et al., 1996).

F. heteroclitus transferidos da AM para AD apresentaram alterações na morfologia das CRMs e nas proteínas (bombas, canais e transportadores) presentes nessas células as quais se modificaram do tipo CRM-AM para o tipo CRM-AD e posteriormente foram substituídas por novas CRMs-AD recém formadas (KATOH; KANEKO, 2003) As mudanças na superfície apical das CRMs descritas para *F. heteroclitus* se assemelha as apresentadas por *P. vivipara*, ou seja, as CRMs sofreram mudança estrutural e funcional passando de uma célula adaptada para excretar íons para uma adaptada a absorção de íons. O aumento de AFCRM e da CRMdens apresentada nos peixes aclimatados a AD para a aumentar a absorção de íons pode implicar em um aumento do consumo de oxigênio para a diferenciação e geração de novas CRMs.

O muco na superfície branquial auxilia na regulação iônica e osmótica (JAKOWSKA 1963; NEGUS, 1963; INGRAM, 1980; ELLIS 1981; SHEPHARD, 1994) e pode servir como uma barreira para difusão de íons auxiliando na manutenção do equilíbrio iônico além de auxiliar na atividade da AC extracelular junto ao epitélio facilitando o gradiente de difusão na excreção de CO₂ e amônia (SHEPHARD, 1994). As altas AFM e CMden observadas em brânquias de *P. vivipara* aclimatados a AM, AS-16 e AS-8 sugerem uma maior produção e liberação de muco o que criaria uma barreira maior contra a difusão de íons para o interior da brânquias.

Estresse induzido por mudança de salinidade tem sido associado com um maior consumo de oxigênio a fim de aumentar a demanda energética para os mecanismos de regulação iônica gerando assim um aumento na geração espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos oxidativos (SIERS, 1985, LIU et al, 2007). Poucos estudos avaliaram o efeito da salinidade sobre o estresse oxidativo em peixes e, principalmente, no tecido branquial. MARTINEZ-ALVAREZ et al., (2002) verificou o mecanismo antioxidante e dano lipídico no plasma de *Acipenser naccarii* aclimatados a água doce durante estresse hiperosmótico e observou um

aumento das enzimas antioxidantes e da LPO conforme aumentou a salinidade. *Paralichthys olivaceus* submetido a estresse hiposmótico aumentou a expressão de enzimas antioxidantes quando mantidos na salinidade 4‰ e diminuiu quando exposição a água doce. Em invertebrados, também foram encontradas variações na atividade de enzimas antioxidantes quando submetidos a variações de salinidade sugerindo que as alterações de salinidade pode ser o fator abiótico que causa alterações nas defesas antioxidantes e danos lipídicos (LIU et al., 2007; BEBIANNO et al., 2007).

CHONG et al., (2006) encontrou proteínas de defesas, como as *heat shock protein* (HSP 70) e tioredoxina peroxidase, no muco de *Symphysodon aequifasciata*. Tiorredoxina peroxidase pertence à família de peroxirredoxinas que inclui tioredoxina e tioredoxina redutase e é essencialmente responsável por mediar o stress oxidativo celular. As HSP 70 são proteínas que respondem frente a diversos estressores bióticos e abióticos, especificamente essas proteínas são envolvidas em manter a integridade celular.

A GST pode inativar os produtos de lipoperoxidação, hidroperóxidos lipídicos e seus derivados. GST atua diretamente inativando as ROS através de grupos sulfidril (SH) (DOYEN et al., 2008). As brânquias de *P. vivipara* apresentaram um aumento da atividade da GST quando aclimatadas na AD, esse aumento sugere que a salinidade pode ser um fator abiótico que modula a atividade da GST. BEBIANNO et al. (2007) também observou alta atividade da GST em *Mytilus gallo* de locais que possuíam baixa salinidade.

No presente estudo houve um aumento da LPO em *P. vivipara* aclimatados a AD pode estar relacionado aos ajustes osmorregulatórios observado, como por exemplo, o aumento da densidade de CRMs que geraria um custo energético mais elevado e conseqüentemente aumentaria o consumo de oxigênio aumentando a geração de EROS. Entretanto, o maior valor da LPO foi observado nos animais aclimatados a AS-16, sugerindo que o alto valor da ACAP encontrado nesse grupo pode ser uma resposta compensatória frente ao aumento do dano lipídico no tecido branquial. Os valores de LPO observados em *P. vivipara* AS-8 pode estar associado a três fatores: a estimulação da ACAP, ao aumento da AFCM e da CMden e ao aumento na atividade da GST enquanto que o baixo nível de LPO observado nos animais aclimatados a AD também pode estar relacionado com o aumento na atividade da GST.

Alterações histopatológicas podem ocorrer frente a variações ambientais e a diferentes qualidades de água (XING; LI; et al., 2012). Entretanto, a aclimação a diferentes salinidades para essa espécie não causam lesões graves no tecido branquial.

De maneira geral foram encontradas alterações na atividades das enzimas envolvidas na íono e osmorregulação, nos parâmetros envolvendo o estresse oxidativo e na morfologia das CMs e das CRMs conforme a aclimação a diferentes salinidades. Isso significa que a salinidade é um fator abiótico que modula a resposta desses biomarcadores o que dificulta a implementação desses biomarcadores como uma ferramenta prática para de avaliação sub-letal de contaminação ambiental em ambientes estuarinos.

6.2. Exposição a atrazina em diferentes salinidades

A exposição à atrazina em todas as salinidades de aclimação promoveu distúrbios íono e osmorregulatórios em *P. vivipara*. A atividade da NKA diminuiu em brânquias de animais expostos a atrazina quando aclimatados a AS-16 e AS-8 e pode estar relacionada com a diminuição da densidade de CRMs observadas uma vez que essas células são ricas em NKA.

Clarias gariepinus (espécie de água doce) expostas a 100 µg/L de atrazina diminuiu a atividade da NKA e a concentração de Na⁺ no plasma nas primeiras 9 horas de exposição e, após 24 horas de exposição, ocorreu um aumento da atividade da NKA e uma recuperação dos níveis de Na⁺ plasmático sugerindo que atrazina possui um efeito depressor da atividade da NKA gerando a diminuição concentração de Na⁺ nas primeiras horas de exposição e depois houve um aumento da atividade da NKA como mecanismo compensatório (ASSEM et al., 1995). O mesmo pode ter ocorrido com *P. vivipara* aclimatados a AM e a AD, pois o desequilíbrio iônico é mais fácil nesses meios.

A atividade da anidrase carbônica (CA) foi inibida frente à exposição à atrazina em todas as salinidades de aclimação. Em um estudo recente PAULINO; SAKURAGUI; FERNANDES, (2012) ao expor a espécie *P. lineatus* a 25 µg.L⁻¹ por 14 dias observou uma inibição da atividade da CA. Outros estudos como os realizados por CEYHUN et al., (2010) e EKINCI; BEYDEMIR, (2010) demonstraram

inibição dose-depente em extratos purificados de CA de tecidos de truta por piretróides e agrotóxicos baseados em dinitrofenilo. A inibição da atividade da CA implica na diminuição da hidratação do CO_2 , conseqüentemente, a diminuição no fornecimento de HCO_3^- e H^+ para os trocadores iônicos apicais Na^+/H^+ (NH_4^+) e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ que pode ocasionar uma diminuição na excreção de H^+ e absorção de excreção de Na^+ e Cl^- . A diminuição da atividade da CA observada em brânquias de *P. vivipara* aclimatados a AD, no presente estudo, pode estar relacionada com a diminuição da densidade de CRMs.

O aumento da V-HA em brânquias de *P. vivipara* expostos a atrazina pode ser uma resposta compensatória do sistema de troca iônica frente à ação depressora da atrazina sobre a NKA e a CA. *P. lineatus* expostos a baixas concentrações de atrazina (2, 10 e 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) apresentou uma diminuição na densidade de células imunomarcadas para NKA e na atividade da CA, entretanto apesar de esperado uma diminuição nas concentrações plasmáticas de Na^+ e Cl^- essa diminuição não foi observada (PAULINO; SAKURAGUI; FERNANDES, 2012), sugerindo que outros mecanismos estão envolvidos na absorção de íons como por exemplo a V-HA. Entretanto a tendência de diminuição da atividade da V-HA observada na concentração de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em todas as salinidades de aclimação sugere que concentrações de atrazina acima de 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pode começar a ter um efeito negativo sobre essa enzima.

As alterações morfológicas das células constituintes do epitélio branquial quando submetidas à exposição à xenobióticos pode ser uma resposta compensatória frente a algum desequilíbrio dos mecanismos de troca iônica, uma vez que o balanço iônico não depende somente de mecanismos bioquímicos (PAULINO; SAKURAGUI; FERNANDES, 2012). PERRY et al. (1992) estabeleceram uma correlação positiva entre a AFCRM 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 AFCRM 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; PERNA-MARTINS, 2002). O cortisol ativa a diferenciação para formação de novas CRMs no epitélio branquial e estudos mostraram um aumento na atividade da NKA, densidade de CRM e da AFCRM quando animais são submetidos a injeções de cortisol. NASCIMENTO et al.,

(2012) discute que a atrazina possivelmente possui um efeito na interrenal e também pode afetar o eixo HPI (no hipotálamo e/ou na glândula pituitária) afetando a liberação de cortisol.

A diminuição da AFCRM e da CRMden encontradas em brânquias de *P. vivipara* exposto a atrazina pode ter ocorrido ou por um efeito degenerativo da atrazina sobre as CRMs ou pela ausência de cortisol o que diminuiria a taxa de diferenciação dessas células. Ambos os casos sugerem que a atrazina gerou degeneração e morte dessas células o que pode levar a uma menor capacidade osmorregulatória nesses peixes uma vez que também foi observado diminuição na atividade da NKA nos animais aclimatados as AS -16 e AS-8 e da CA em todas as salinidades de aclimação.

A exposição à atrazina pode estimular e/ou inibição a atividade de enzimas associadas aos mecanismos de defesa antioxidante (ELIA et al., 2002; JIN, et al., 2010; XING; LI; et al., 2012; BLAHOVÁ et al., 2013). JIN et al., (2010) ao expor o *Danio rerio* a concentrações de 1, 10, 100 e 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina observou uma diminuição dose-dependente de GSH nos ovários e no fígado. A diminuição da ACAP nas brânquias de *P. vivipara* aclimatados a água salobra (AS), pode ter ocorrido por uma diminuição nas concentrações de GSH uma vez que é o substrato da GPx, que atua como principal via de degradação de radicais peróxido.

A GST tem importante função na proteção contra xenobióticos (FROVA, 2006; BLANCHETTE et al., 2007). Assim, a detoxificação de xenobióticos e defesa antioxidante, via GST, têm sido investigada em muitas espécies de peixes (SAYEED et al., 2003; MORTENSEN; ARUKWE, 2007; MONFERRAN et al., 2008). O aumento na atividade da GST branquial de *P. vivipara* expostos a atrazina e aclimatados a AS-8 e AD e a diminuição em animais expostos a atrazina e aclimatados a AM e AS-16 sugere que *P. vivipara* apresenta mecanismos diferentes de eliminação de atrazina dependendo da salinidade onde se encontra. PAULINO; SOUZA; FERNANDES, (2012) sugerem que o aumento da GST em brânquias de *P. lineatus* expostos a atrazina se deve pelo fato da GST estar atuando como a principal via de eliminação desse composto. XING; WANG; et al., (2012) sugerem que a inibição da GST pode ocorrer por meio de ação direta de atrazina na enzima, de forma indireta através da produção de espécies reativas de oxigênio, que interagem diretamente com a enzima, por meio do esgotamento de seu substrato (GSH) ou através da baixa regulação dos genes de GST por diferentes mecanismos.

O aumento na peroxidação lipídica após exposição a atrazina pode ser atribuído à indução de EROS, o que aumenta a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que levam a peroxidação lipídica (VALAVANIDIS et al., 2006, LIU et al., 2008). *Lepomis macrochirus* expostos a altas concentrações de atrazina (3000, 6000 e 9000 $\mu\text{g.L}^{-1}$) apresentou aumento da LPO somente nas duas concentrações mais altas sugerindo uma baixa sensibilidade do tecido branquial a atrazina (ELIA et al., 2002), ou seja, 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). Essa baixa sensibilidade a atrazina pode explicar a ausência de aumento da LPO nos animais aclimatados a AM e a AS-16.

O aumento da LPO em brânquias de *P. vivipara* aclimatados a AD e exposto a atrazina pode ter sido ocasionado pelos efeitos da aclimação e a ação do xenobiótico. O aumento na atividade da NKA, na atividade da V-HA, na densidade e área fracional de CRM pode ter gerado um aumento no consumo de oxigênio aumentando assim à produção de EROS e conseqüentemente alterando o mecanismo de defesa antioxidante sugerindo que a espécie *P. vivipara* submetidos a variações de salinidade está mais sujeita a um quadro de estresse oxidativo caso também sejam submetidos a contaminação ambiental.

O aumento da LPO em *P. vivipara* aclimatados a AS-8 e expostos a atrazina não era esperado uma vez que animais aclimatados a essa salinidade apresentaram altos valores de ACAP e precisam de um menor consumo de oxigênio para manter os mecanismos de íono e osmorregulação uma vez que a osmolalidade da água está muito próxima da osmolalidade plasmática de peixes teleósteos.

A densidade das células mucosas, assim como a produção de muco, varia entre as diferentes espécies e também dependendo das condições ambientais como, por exemplo, salinidade e a exposição a agentes poluidores (LAURENT, 1984; MORON et al., 2009). Proteínas antioxidantes como tioredoxina peroxidase foram encontradas no muco de *Symphysodon aequifasciata*. (CHONG et al., 2006), sugerindo que o aumento da produção/secreção de muco pode auxiliar os mecanismos de defesa antioxidante. Desta forma, o aumento dose-dependente da AFCM em *P. vivipara* aclimatados a AS-16 pode ser uma resposta frente a diminuição da ACAP encontrada no mesmos grupos. O aumento tanto da densidade de CM como da AFCM em *P. vivipara* aclimatados a AD pode ser uma resposta frente ao aumento da LPO encontrado nesses animais. Nos animais aclimatados a

AS-8 somente o grupo exposto a $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ não apresentou aumento no níveis de LPO, neste mesmo grupo foi observado um aumento na densidade de CM.

P. lineatus apresentou um diminuição de CM responsáveis por liberar muco composto por estéres sulfatados quando expostos a atrazina, sugerindo que a diminuição na densidade desse tipo de células mucosas pode ser um mecanismo para favorecer a lavagem da substância tóxica para longe da superfície branquial (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012). Nesse trabalho não foi analisado a constituição do muco produzido pelas CM, contudo sugere-se ter ocorrido respostas semelhantes observadas em *P. lineatus* nos grupos de *P. vivipara* aclimatados a AM e expostos a atrazina.

Portanto, o aumento da densidade e/ou área fracional das CMs em *P. vivipara* aclimatados a AS-16 e AS-8 podem ser um mecanismo de defesa que previne a absorção da atrazina pelas brânquias e, indiretamente, estar relacionados às alterações da ACAP e LPO nesses grupos. Em peixes estenoalinos como o *P. lineatus* a diminuição de CM que produz estéres sulfatados em animais expostos a atrazina sugere que a diminuição na densidade desse tipo de CM pode ser um mecanismo para favorecer a lavagem da substância tóxica para longe da superfície branquial (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012). Entretanto, a análise das CMs, via microscopia eletrônica de varredura, não permite avaliar o tipo de substancias produzidas pelas CMs observadas em *P. vivipara*.

Alterações no tecido branquial podem prejudicar substancialmente a função desse órgão em peixes (COUCH; FOURNIE, 1993; XING; LI; et al., 2012). Alguns poluentes atuam diretamente sobre o tecido branquial, porém a maioria das alterações são 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). Alterações na frequência e severidade de histopatologias brânquiais foram observadas em *P. lineatus* quando exposto a baixas concentrações de atrazina ($2, 10$ e $25 \mu\text{g.L}^{-1}$) por 14 dias entretanto não foi observado aumento da frequência e severidade nos animais expostos a mesmas concentrações por 48 h (PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012b). No presente estudo a exposição à atrazina por 96 horas não causou um aumento significativo na frequência e severidade das lesões nas brânquias de *P. vivipara*, talvez em função do curto tempo de exposição e das baixas concentrações utilizadas. Alterações histopatológicas severas frente à exposição à atrazina

ocorreram em animais expostos a concentrações mais elevadas ou exposições mais prolongadas (JAYACHANDRAN; PUGAZHENDY, 2009, PAULINO; SOUZA; FERNANDES, 2012).

Alterações como hiperplasia e hipertrofia do epitélio respiratório, descolamento epitelial, fusão de algumas lamelas além da proliferação de CRMs e de CMs são conhecidas por serem alterações inespecíficas que podem ser causadas por uma variedade de estressores, tais como xenobióticos, infecções por microorganismos e presença de ectoparasitos (MALLAT, 1985; HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al., 1992). Dessas alterações, hiperplasia e hipertrofia do epitélio respiratório podendo ou não causar fusão de algumas lamelas e proliferação de CMs, são exemplos de respostas de defesa, uma vez que aumentam a distância entre o meio externo e o sangue, servindo como barreira para a entrada de contaminantes na corrente sanguínea (MALLAT, 1985; HINTON; LAURÉN, 1990; POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; FERNANDES; MAZON, 2003). O aumento da densidade e área fracional das CRMs são respostas compensatórias que tendem a manter a homeostase iônica, embora o aumento das CRMs também contribuem para o aumento da distância água-sangue. Nesse sentido, investigações dos aspectos do tecido branquial, assim como respostas compensatórias são ferramentas importantes na detecção dos efeitos de várias substâncias, e contribuem para uma melhor compreensão das respostas frente as alterações ambientes (SADAUSKAS-HENRIQUE, 2008).

As alterações observadas nos animais expostos as concentrações de 2, 10 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de atrazina podem provocar efeitos adversos à sua saúde, e esses efeitos podem ser agravados em animais estuarinos devido as mudanças constantes na salinidade da água. O custo energético para restaurar as condições normais do organismo pode ocorrer em detrimento de outras funções como crescimento e reprodução, além da possibilidade de ocorrer exaustão nestes animais se o ambiente permanecer contaminado, aumentando assim o risco de doenças e consequentemente a mortalidade destes indivíduos.

7. Conclusões

Os resultados obtidos em relação à aclimação a diferentes salinidades permitem concluir que:

1. A densidade e área fracional das CRMs aumentam na densidade e área fracional quando animal é aclimatado a água doce.
2. A morfologia das células mucosas se altera conforme a aclimação as diferentes salinidades.
3. A aclimação a diferentes salinidades altera a capacidade antioxidante contra radicais peróxido, onde os maiores valores foram observados nos animais aclimatados a águas salobras.
4. A atividade da GST aumenta conforme a diminuição da salinidade.
5. Animais aclimatados a água doce são mais propensos a um quadro de estresse oxidativo frente a exposição a atrazina.
6. A aclimação a diferentes salinidades não altera a frequência de histopatologias nem altera o IAH

O fato da salinidade ser um fator abiótico que modula a resposta dos biomarcadores apresentados nesse estudo indica a dificuldade do uso dessas análises como ferramenta de avaliação ambiental em ambientes estuarinos.

Os resultados obtidos em relação à exposição a diferentes concentrações de atrazina em animais aclimatados a diferentes salinidades permitem concluir que:

- 1- A NKA apresenta respostas diferentes frente à exposição à atrazina dependendo da salinidade de aclimação
- 2- A V-HA aumenta a atividade nas concentrações mais baixas de atrazina possivelmente como resposta compensatória a diminuição da CA e da NKA.
- 3- A atrazina inibe a atividade da anidrase carbônica.
- 4- A atrazina diminui a densidade e área fracional das CRMs nas 4 salinidades de aclimação.

- 5- A ACAP e a GST respondem de forma distinta para cada salinidade as quais os animais foram submetidos.
- 6- Atrazina causou dano oxidativo nos animais aclimatados a água doce e a AS-8, evidenciado pelo aumento da LPO.
- 7- A resposta na densidade e área fracional das células mucosas frente a exposição a atrazina pode estar relacionada a necessidade de aumento de defesas do organismo.
- 8- A atrazina não causou alterações na frequência e severidade das histopatologias branquiais nas diferentes salinidades.

Considerando o aumento contínuo das concentrações de atrazina nos ambientes aquáticos, os resultados deste estudo são importantes para o melhor entendimento da toxicidade deste composto e seus efeitos subletais em uma espécie estuarina nativa e de importância ecológica, uma vez que há pouca informação disponível sobre sua toxicidade em peixes de ambientes estuarinos e que não há um limite máximo permitido nos ambientes aquáticos marinhos e salobros pelos órgãos reguladores do país.

8. REFERÊNCIAS

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

ABRAHAM, M.; IGER, Y.; ZHANG, L. Fine structure of the skin cells of a stenohaline freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to diluted seawater. *TISSUE CELL*, v. 33, n. 1, p. 46–54, 2001.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *MEGADIVERSIDADE*, v. 1, n. 1, p. 70–8, 2005.

AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *CHEMOSPHERE*, v. 65, n. 6, p. 952–62, 2006.

ALDA, F.; REINA, R. G.; DOADRIO, I.; BERMINGHAM, E. Phylogeny and biogeography of the *Poecilia sphenops* species complex (Actinopterygii, Poeciliidae) in Central America. *MOL PHYLOGENET EVOL*, v. 66, n. 3, p. 1011–26, 2013.

ALVES, M. L. P. Toxicidade e alterações hematológicas, morfológicas, bioquímicas e genéticas em curimatás *Prochilodus lineatus*, (TELEOSTEI, PROCHILODONTIDAE) expostos ao fenantreno. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

- AMADO, L. L.; DA ROSA, C. E.; LEITE, A. M.; MORAES, L.; PIRES, W. V.; PINHO, G. L.; MARTINS, C. M.; ROBALDO, R. B.; NERY, L.E.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, P. E.; GERACITANO, L. A. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxic and immunological effects. MAR POLLUT BULL, v. 52(2), p.199-206, 2006.
- AMADO, L. L.; LONGARAY, M.; BAPTISTA, P.; SARKIS, J.; MONSERRAT, J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. SCI TOTAL ENVIRON, v. 407, p. 2115-23, 2009.
- AMARAL, M. .; BONECKER, A. C.; ORTIZ, C. H. Determination of Na⁺/K⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase Enzymes in the Gill of *Poecilia vivipara* (Osteichthyes, Cyprinodontiformes) in Different Salinities. BRAZ ARCH BIOL TECHNOL, v. 44, n. 1, p. 1–6, 2001.
- ARCHANGELO, E.R. Sorção, desorção e potencial de lixiviação de atrazine e dimethenamide em solos brasileiros. Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- ASSEM, H.; ELSAEID, I.; HEGAB, S. A. B. O. In Vivo Changes in the Activity of Gill ATPases , Muscle Cell Volume , and Plasma and Cellular Ionic Concentration of the African Catfish , *Clarias gariepinus* Induced by Atrazine or DDT at Different Sublethal Concentrations. MAR SCI, v. 6, p. 135–50, 1995.
- AWOSIKA, L.; MARONE, E. Scientific needs to assess the health of the oceans in coastal areas: a perspective of developing countries. OCEAN COAST MANAG, v. 43, p. 781-91, 2000.
- BATTAGLIN,W.A.; FURLONG, E.T.; BURKHARDT, M.R.; 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, v. 248, p. 123–33, 2000.
- BEBIANNO, M. J.; LOPES, B.; GUERRA, L.; HOARAU, P.; FERREIRA, A. M. Glutathione S-transferases and cytochrome P450 activities in *Mytilus galloprovincialis* from the South coast of Portugal: effect of abiotic factors. ENVIRON INT, v. 33, n. 4, p. 550–8, 2007.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVÁ, Z., FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. LIFE SCIENCES v. 65, p. 1865-74, 1999.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J DIS, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BINDON, S.; GILMOUR, K.; FENWICK, J.; PERRY, S. the Effects of Branchial Chloride Cell Proliferation on Respiratory Function in the Rainbow Trout *Oncorhynchus Mykiss*. J EXP BIOL, v. 197, n. 1, p. 47–63, 1994.

BLAHOVÁ, J.; PLHALOVÁ, L.; HOSTOVSKÝ, M.; DIVISOVÁ, L.; DOBSIKOVÁ, R.; MIKULÍKOVÁ, I.; STEPANOVÁ, S.; SVOBODOVÁ, Z. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *FOOD CHEM TOXICOL*, *in press*, 2013.

BLANCHETTE, B.; FENG, X.; SINGH, B.R. Marine glutathione S-transferases. *MAR. BIOTECHNOL.* v. 23, p. 513–542, 2007.

BYSTRIANSKY, J. S.; SCHULTE, P. M. Changes in gill H⁺-ATPase and Na⁺/K⁺-ATPase expression and activity during freshwater acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J EXP BIOL*, v. 214, n. 14, p. 2435–42, 2011.

CABRAL, M. F.; SOUZA, D.; ALVES, C. R.; MACHADO, S. A. S. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. *ECLÉTICA QUÍMICA*, v.28, n.2, p.41-47, 2003.

CALLISTO, M.; MORETTI, M.; GOULART, M. D. C. Macroinvertebrados bentônicos como ferramenta para avaliar a saúde de riachos. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, v. 6 (1), p. 71-82, 2001.

CAVICCHIOLI-AZEVEDO, V. Efeitos do cobre sobre o estresse oxidativo na anêmona-do-mar *Actinia bermudensis*. Universidade Federal do Rio Grande, 2011

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, MARISA N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *ECOTOX ENVIRON SAFE*, v. 52, n. 2, p. 83–91, 2002.

CEYHUN, S.B.; SENTÜRK, M.; ERDOGAN, O.; KÜFREVIÖGLU, O.I. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. *PESTIC BIOCHEM PHYSIOL*, v. 97, p. 177–81, 2010.

CLARK, R. B. *Marine Pollution*, Clarendon Press, Oxford, U.K., 172 p, 1992.

CORRÊA, A. X. R.; TIEPO, E. N.; SOMENSI, C. A.; SPERB, R. M.; RADETSKI, C. M. Use of Ozone-Photocatalytic Oxidation (O₃/UV/TiO₂) and Biological Remediation for Treatment of Produced Water from Petroleum Refineries. *J. ENVIRONM EN ASCE*, p. 40-5, 2010.

COSTA, W. J. E. M. Relationships monophyly and three new species of the Neotropical miniature poeciliid fish genus *Fluviphylax* (Cyprinodontiformes, Cyprinodontoidei). *ICHTHYOL EXPLOR FRES*, v.7(2), p.111-30, 1996.

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

CHANG, I.C.; LEE, T.H.; WU, H.C.; HWANG, P.P. Effects of environmental Cl⁻ levels on Cl⁻ uptake and mitochondria-rich cell morphology in gills of the stenohaline goldfish, *Carassius auratus*. *ZOOL STUD*, v. 41, p. 236–43, 2002.

CHAPADENSE, P. F. G.; CASTRO, F. D. J.; ALMEIDA, J. A.; MORON, S. E. Toxicity of atrazine herbicide in *Colossoma macropomum*. REV BRAS SAÚDE PROD AN, v. 10, n. 2, p. 398–405, 2009.

CHOI, C. Y.; AN, K. W.; AN, M. I. Molecular characterization and mRNA expression of glutathione peroxidase and glutathione S-transferase during osmotic stress in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). COMP BIOCHEM PHYSIOL A, v. 149, n. 3, p. 330–7, 2008.

CHONG, K.; JOSHI, S.; JIN, L. T.; SHU-CHIEN, A. C. Proteomics profiling of epidermal mucus secretion of a cichlid (*Symphysodon aequifasciata*) demonstrating parental care behavior. PROTEOMICS, v. 6, n. 7, p. 2251–8, 2006.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H.G. (eds.) Bioindicators and Biomonitoring. Elsevier, p. 639-71, 2003.

CONAMA Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Resolução CONAMA Nº 357, de 17 de março de 2005. Classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento.

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

DEZFULI, 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 ORGAN, v. 53, n. 3, p. 257–62, 2003.

DÍAZ-JARAMILLO, M.; SOCOWSKY, R.; PARDO, L. M.; MONSERRAT, J. M.; BARRA, R. Biochemical responses and physiological status in the crab *Hemigrapsus crenulatus* (Crustacea, Varunidae) from high anthropogenically-impacted estuary (Lenga, south-central Chile). MAR. ENVIRON. RES. v. 83, p. 73-81, 2013.

DOYEN, P.; BIGOT, A.; VASSEUR, P.; RODIUS, F. Molecular cloning and expression study of pi-class glutathione S-transferase (pi-GST) and selenium-dependent glutathione peroxidase (Se-GPx) transcripts in the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. COMP BIOCHEM PHYSIOL C, v. 147, n. 1, p. 69–77, 2008.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. METHODS ENZYMOL, v.186, p.421-31. 1990.

EKINCI, D.; BEYDEMIR, S. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid–base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. PESTIC BIOCHEM PHYSIOL, v. 97, p. 66–70, 2010.

ELIA, A C.; WALLER, W. T.; NORTON, S. J. Biochemical responses of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*, Rafinesque) to atrazine induced oxidative stress. B ENVIRON CONTAM TOX, v. 68, n. 6, p. 809–16, 2002.

ELLIS, A.E. Non-specific defence mechanisms in fish and their role in disease processes. *DEV BIOL STAND*, v. 49, p. 337-52, 1981.

EVANS, D. H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *AM J PHYSIOL-REG I*, v. 295, n. 2, p. R704-13, 2008.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *PHYSIOL REV*, v. 85, p. 97-177, 2005.

FAUSCH, K.D.; LYONS, J.; KARR, J.R.; ANGERMEIER, P.L. Fish communities as indicators of environmental degradation, p.123-124. In: Biological indicators of stress in fish. ADAMS, S.M. [ed] American Fisheries Society, Symposium 8., American Fisheries Society. Bethesda, Maryland. 1990.

FENG, S. H.; LEU, J. H.; YANG, C.H.; FANG, M. J.; HUANG, C. J.; HWANG, P. P. Gene expression of Na⁺/K⁺-ATPase alpha 1 and alpha 3 subunits in gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*, adapted to different environmental salinities. *MAR BIOTECHNOL*, v. 4, n. 4, p. 379-91, 2002.

FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *TOXICOLOGY*, v. 205, n. 3, p. 223-40, 2004.

FERNANDES, A. R.; DURÃO, P. J.; SANTOS, P. M.; SÁ-CORREIA, I. Activation and significance of vacuolar H⁺-ATPase in *Saccharomyces cerevisiae* adaptation and resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *BBRC*, v. 312, n. 4, p. 1317-24, 2003.

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, p. 203-31, 2003.

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)*, v. 83, p. 321-28, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Defesa e estresse oxidativo. *REV ASS MED BRASIL*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FIOCRUZ. RADIS - Comunicação em saúde. , v. 95, p. 23, 2010.

FORTIN, M.-G.; COUILLARD, C. M.; PELLERIN, J.; LEBEUF, M. Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae. *MAR ENVIRON RES*, v. 65, n. 2, p. 158-70, 2008.

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*, v. 46, p. 685-695, 2003.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. ANNU REV BIOCHEM, v.64, p.97-112, 1989.

FRIDOVICH, I. Mitochondria : are they the seat of senescence ? Aging Cell, v. 3, n. November 2003, p. 13–6, 2004.

FROVA, C. Glutathione S-transferases in the genomics era: new insights and perspectives. BIOMOL. ENG, v. 23, p. 149–69, 2006.

FUNES, V.; ALHAMA, J.; NAVAS, J. I.; LÓPEZ-BAREA, J.; PEINADO, J. Ecotoxicological effects of metal pollution in two mollusc species from the Spanish South Atlantic littoral. ENVIRON POLLUT, v. 139, n. 2, p. 214–23, 2006.

GILMOUR, K. M. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. RESP PHYSIOL NEUROB, v. 184 (3), p. 223–30, 2012.

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? NATURE PUBLISHING GROUP, v. 8, p. 722–8, 2007.

GHEDOTTI, M. J. Phylogenetic analysis and taxonomy of the poeciloid fishes (Teleostei, Cyprinodontiformes). ZOOLOGICAL J LINN SOC-LOND, v. 130, p.1-53, 2000.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. ENVIRON INT, v. 26, n. 7-8, p. 483–95, 2001.

GUADALUPE CABRAL, M.; SA-CORREIA, I.; VIEGAS, C. A. Adaptive responses in yeast to the herbicide 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid at the level of intracellular pH homeostasis. J APPL MICROBIOL, v. 96, n. 3, p. 603–12, 2004.

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.

GLOTFELTY, D.E.; TAYLOR, A.W.; ISENSEE, A.R.; JERSEY S. GLEN. J. Atrazine and simazine movement to Wye River estuary. J ENVIRON QUAL, v. 13, p. 115–21, 1984.

GOMES, J. L.; MONTEIRO, L. R. Morphological divergence patterns among populations of *Poecilia vivipara* (Teleostei Poeciliidae): test of an ecomorphological paradigm. BIOL J LINNEAN SOC, v. 93, p. 799–812, 2008.

HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. METHODS ENZYMOL, v. 77, p. 398–405, 1981.

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, v. 35, p. 737- 47, 1989.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *METHODS ENZYMOL*, v. 186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, New York, 2007.

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

HERMES-LIMA, M. ROLE OF FREE RADICALS. *Funcional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley ed., p.319–68, 2004.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic Biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p. 155 –96, 1992.

HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. *American Fisheries Society Symposium*, n. 8, p. 51- 66, 1990.

HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *COMP BIOCHEM PHYSIOL B*, v. 136, n. 4, p. 593–620, 2003.

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

HOSSLER, F.E.; MUSIL, G.; KARNAKY, K.J.; EPSTEIN, F.H. Surface ultrastructure of the gill arch of the killifish, *Fundulus heteroclitus*, from seawater and fresh water, with special reference to the morphology of apical crypts of chloride cells. *J MORPHOL*, v. 185, p. 377–86, 1985.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *COMP BIOCHEM PHYSIOL A*, v. 148, n. 3, p. 479–97, 2007.

IBAMA. Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental. 2010.

INGRAIN, G.A. Substances involved in the natural resistance of fish to infection - a review. *Z FISH BIOL*, v. 16, p. 23-60, 1980.

INOKUCHI, M.; HIROI, J.; WATANABE, S.; LEE, K. M.; KANEKO, T. Gene expression and morphological localization of NHE3, NCC and NKCC1a in branchial mitochondria-rich cells of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) acclimated to a wide range of salinities. *COMP BIOCHEM PHYSIOL A*, v. 151, n. 2, p. 151–8, 2008.

- INOKUCHI, M.; KANEKO, T. Recruitment and degeneration of mitochondrion-rich cells in the gills of Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* during adaptation to a hyperosmotic environment. *COMP BIOCHEM PHYSIOL A*, v. 162, n. 3, p. 245–51, 2012.
- ISENSEE, A.R. Persistence and movement of atrazine in a salt marsh sediment microecosystem. *BULL ENVIRON CONTAM TOXICOL*, v.39, p. 516–523, 1987.
- JAKOWSKA, S. Mucus secretion in fish. *ANN NYACAD SCI*, v. 106, p. 458-62, 1963.
- JAYACHANDRAN, K.; PUGAZHENDY, K. Histopathological changes in the gill of *Labeo rohita* (Hamilton) finger lings exposed to atrazine. *AMERICAN-EURASIAN J. SCIENT. RES*, v. 4, p. 219–22, 2009.
- JENSEN, M. K.; MADSEN, S. S.; KRISTIANSEN, K. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the gills of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J EXP ZOOL*, v. 282, n. 3, p. 290–300, 1998.
- JIN, Y.; ZHANG, X.; SHU, L.; CHEN, L.; SUN, L.; QIAN, H.; LIU, W.; FU, F. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *CHEMOSPHERE*, v. 78, n. 7, p. 846–52, 2010.
- JONES, T.W., KEMP, W.M., STEVENSON, J.C., MEANS, J.C. Degradation of atrazine in estuarine water/sediment systems and soils. *J ENVIRON QUAL*, v. 11, p. 632–8, 1982.
- KANEKO, T.; WATANABE, S.; LEE, K. M. Functional Morphology of Mitochondrion-Rich Cells in Euryhaline and Stenohaline Teleosts. *AQUA-BIOSCI MONOGR*, v. 1, n. 1, p. 1–62, 2008.
- KANG, C. K.; LIU, F. C.; CHANG, W. B.; LEE, T. H. Effects of low environmental salinity on the cellular profiles cotransporter 1 of branchial mitochondrion-rich cells in the juvenile marine fish *Monodactylus argenteus*. *FISH PHYSIOL BIOCHEM*, v. 38, p. 665–78, 2012.
- KANG, C. K.; TSAI, S. C.; LEE, T. H.; HWANG, P.P. Differential expression of branchial Na⁺/K⁺-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. *COMP BIOCHEM PHYSIOL A*, v. 151, n. 4, p. 566–75, 2008.
- KANG, C. K.; YANG, W. K.; LIN, S. T.; LIU, C. C.; LIN, H. M.; CHEN, H. H.; CHENG, C. W.; LEE, T. H.; HWANG, P. P. The acute and regulatory phases of time-course changes in gill mitochondrion-rich cells of seawater-acclimated medaka (*Oryzias dancena*) when exposed to hypoosmotic environments. *COMP BIOCHEM PHYSIOL A*, *in press*, 2012.
- KARR, J.R. Assessment of biotic integrity using fish communities. *FISHERIES*, v.6, p.21- 7, 1981.

KATOH, F.; KANEKO, T. Short-term transformation and long-term replacement of branchial chloride cells in killifish transferred from seawater to freshwater, revealed by morphofunctional observations and a newly established 'time-differential double fluorescent staining' technique. J EXP BIOL, v. 206, n. 22, p. 4113–23, 2003.

KLINGMAN, R. Weed Science: Principles and Practices. 2a ed. New York, John Wiley, P. 449, 2001

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, v. 26, p. 1007–17, 1997.

KULTZ, D.; BASTROP, R.; JURSS, K.; SIEBERS, D. Mitochondria-rich (MR) cells and the activities of the Na⁺/K⁺-ATPase and carbonic anhydrase in the gill and opercular epithelium of *Oreochromis mossambicus* adapted to various salinities. COMP. BIOCHEM. PHYSIOL., v. 102B, n. 2, p. 293–301, 1992.

KULTZ, D.; SOMERO, G. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. J Exp Biol, v. 198, n. Pt 9, p. 1883–94, 1995.

LACERDA, L. D.; MALM, O. Contaminação por mercúrio em ecossistemas aquáticos: uma análise das áreas críticas. ESTUDOS AVANÇADOS, V. 22 (63), p. 173-90, 2008.

LAURENT, P. Internal morphology of the gill. In: Hoar, W. S. and Randall, D. J. (Eds.). Fish Physiology, Orlando, Academic Press, v. 10, p. 73-183, 1984.

LEDY, K.; GIAMBÉRINI, 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 ORGAN, v. 56, n. 3, p. 235–40, 2003.

LEE, T.H.; HWANG, P.P.; LIN, H.C.; HUANG, F.L. Mitochondria-rich cells in the branchial epithelium of the teleost, *Oreochromis mossambicus*, acclimated to various hypotonic environments. FISH PHYSIOL BIOCHEM, v.15, p. 513–523, 1996.

LEHNINGHER, A., NELSON, D. L., COX, M. M. 2005. Princípios de Bioquímica. 4ed, W.H. Freeman.

LIN, Y. M.; CHEN, C. N.; YOSHINAGA, T.; TSAI, S.C.; SHEN, I.D.; LEE, T. H. Short-term effects of hyposmotic shock on Na⁺/K⁺-ATPase expression in gills of the euryhaline milkfish, *Chanos chanos*. COMP BIOCHEM PHYSIOL A, v. 143, n. 3, p. 406–15, 2006.

LIU, Y.; WANG, W.N.; WANG, A.L.; WANG, J.M.; SUN, R.Y. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. AQUACULTURE, v. 265, p.351–8, 2007.

- LIU, Y.; WANG, J.S.; WEI, Y.H.; ZHANG, H.X.; XU, M.Q.; DAI, J.Y. Induction of time-dependent oxidative stress and related transcriptional effects of perfluorododecanoic acid in zebrafish liver. *AQUAT TOXICOL.* v. 89, p. 242–50, 2008.
- LUCINDA, P. H. F. Family Poeciliidae. In Reis, R.E., S.O. Kullander & C. Ferraris Jr. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes*, 2003, Porto Alegre, Edipucrs, p 729.
- LUCINDA, P. H. F.; REIS, R. E. Systematics of the subfamily *Poeciliinae Bonaparte* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae), with an emphasis on the tribe *Cnesterodontini Hubbs*. *NEOTROP ICHTHYOL*, v. 3, n. 1, p. 1–60, 2003.
- MACHADO, A. A. S.; HOFF, M. L. M.; KLEIN, R. D.; CARDOZO, J. G.; GIACOMIN, M. M.; PINHO, G. L. L.; BIANCHINI, A. Biomarkers of waterborne copper exposure in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to salt water. *AQUAT TOXICOL*, v. 138-139c, n. 1, p. 60–69, 2013.
- MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. *CIÊNC BIOL SAÚDE*, Londrina, v. 1, p. 63-76, 1999.
- MACHADO, R. F.; BARROS, A. C. S. A.; ZIMMER, P. D.; AMARAL, A. S. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. *JOURNAL OF SEED SCIENCE*, v. 28, p. 151–60, 2006.
- MAETZ, J. Fish Gills: Mechanisms of salt transfer in fresh water and sea water. *PHIL TRANS R SOC LOND B*, v. 262, n. 842, p. 209–49, 1971.
- MAGALHÃES, M. A. S. Exposição a agrotóxicos na atividade agrícola: um estudo de percepção de riscos à saúde dos trabalhadores rurais no distrito de pau-de-ferro salgueiro-PE. Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2010.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : a statistical review. *Can. J. Fish. AQUAT. SCI.*, 42, 630-48, 1985.
- MARSHALL, W. S.; LYNCH, E. M.; COZZI, R. R. F. Redistribution of immunofluorescence of CFTR anion channel and NKCC cotransporter in chloride cells during adaptation of the killifish *Fundulus heteroclitus* to sea water. *J EXP BIOL*, v. 205, n. Pt 9, p. 1265–73, 2002.
- MARTÍNEZ-ALVAREZ, R. M.; HIDALGO, M. C.; DOMEZAIN, A.; MORALES, A. E.; GARCIA-GALLEGO, M.; SANZ, A. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J EXP BIOL*, v. 205, n. Pt 23, p. 3699–706, 2002.
- MASHITER, K. E.; MORGAN, M. R. J. Carbonic anhydrase levels in the tissues of flounder adapted to seawater and freshwater. *COMP BIOCHEM PHYSIOL.* v. 52A, p. 713-717, 1975.

MAYER, F. L.; VERSTEEG, D. J.; MCKEE, M. J.; FOLMAR, L. C.; GRANEY, R. L.; McCUME, D. C.; RATTNER, B. A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLI, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 155–196, 1992.

MAZZONI, R.; IGLESIAS-RIOS, R. Distribution pattern of two fish species in a coastal stream in southeast Brazil. BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY, v. 62, n. 1, p. 171–8, 2002.

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.

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

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of S-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. FREE RADIC BIOL MED, v. 17, p. 235-48, 1994.

MONFERRAN, M.V.; PESCE, S.F.; CAZENAVE, J.; WUNDERLIN, D.A. Detoxification and antioxidant responses in diverse organs of *Jenynsia multidentata* experimentally exposed to 1,2- and 1,4-dichlorobenzene. ENVIRON TOXICOL, v.23, p. 184–92, 2008.

MORAES, R. Estudos sobre Poluição Marinha: Importância e Perspectivas. In: MORAES, R.; CRAPEZ, M.; PFEIFFER, M. W.; FARINA, M.; BAINY, A.; TEIXEIRA, V. Efeitos de Poluentes em Organismos Marinho. São Paulo, Arte e Ciência Villipress, p. 285, 2001.

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., v. 7, p. 491-8, 2009.

MORTENSEN, A.S.; ARUKWE, A. Effects of 17alpha-ethynylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*). AQUAT TOXICOL, v. 85, p. 113–23, 2007

MOSIALOU, E. Microsomal Glutathione Transferase and Oxidative Stress. 1993, Institute of Environmental Medicine, Division of Toxicology. Estocolomo, Suécia.

NASCIMENTO, C. R. B.; SOUZA, M. M.; MARTINEZ, C. B. R. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. COMP BIOCHEM PHYSIOL C, v. 155, n. 3, p. 456–61, 2012.

- NEGUS, V.E. The function of mucus. ACTA OTO-LARYNGOL, v. 56, p. 204-14, 1963.
- NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA. 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). International journal of environmental research and public health, v. 7, n. 8, p. 3298–312, 2010.
- OAKES, K. D.; KRAAK, G. J. VAN DER. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. AQUAT TOXICOL, v. 63, p. 447–63, 2003.
- OOST, R. VAN DER; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. ENVIRON TOXICOL PHAR, v. 13, n. 2, p. 57–149, 2003.
- OZTÜRK SARIKAYA, S. B.; TOPAL, F.; SENTÜRK, M.; GÜLÇİN, I.; SUPURAN, C. T. In vitro inhibition of α -carbonic anhydrase isozymes by some phenolic compounds. BIOORG MED CHEM LETT, v. 21, n. 14, p. 4259–62, 2011.
- PAMPLONA, J. H. Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Dipirona Sódica em Peixe *Rhamdia Quelen*: Estudo Bioquímico, Hematológico e Histopatológico. 2009, Universidade Federal do Paraná, p. 70.
- PARENTI, L. R. A phylogenetic and biogeographical analysis of Cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha). B AM MUS NAT HIST, v. 168(4), p. 341–557, 1981.
- PARKS, S. K.; TRESGUERRES, M.; GOSS, G. G. Interactions between Na^+ channels and $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ cotransporters in the freshwater fish gill MR cell: a model for transepithelial Na^+ uptake. AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL, v. 292, n. 2, p. 935–44, 2007.
- PAULINO, M G; SAKURAGUI, M. M.; FERNANDES, M N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. CHEMOSPHERE, v. 86, n. 1, p. 1–7, 2012.
- PAULINO, M. G.; SOUZA, N. E. S.; FERNANDES, M. N. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. ECOTOX ENVIRON SAFE, v. 80, p. 6–13, 2012.
- PEREIRA, S. V. Degradação da Atrazina pelo processo UV/H₂O₂ e ozônio, identificação dos intermediários e avaliação da atividade estrogênica, 2011. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- PERRY, S. Integrated responses of $\text{Na}^+\text{/HCO}_3^-$ cotransporters and V-type H^+ -ATPases in the fish gill and kidney during respiratory acidosis. BBA, v. 1618, n. 2, p. 175–84, 2003.

PERRY, S. F.; GOSS, G.G.; LAURENT, P. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. *CAN J ZOOL.* v. 70, p. 1775–86, 1992.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *ANNU REV PHYSIOL.*, v. 59, n. 9, p. 325–47, 1997.

PERRY, S. F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; BAYAA, M.; FURIMSKY, M.; THOMAS, S. L. Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. *J EXP ZOOL PART A*, v. 300, n. 1, p. 53–62, 2003.

PISAM, M.; RAMBOURG, A. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *INT REV CYTOL*, v. 130, p. 191–232, 1991.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MUKLLER, R.; LLOYD, R. Eds. *Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish*. Cambridge Univ. Press, Cambridge - UK, p. 339-352, 1994.

POWEL, 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, p. 392. 2007.

RAMELOW, G.J.; WEBRE, C.L.; MUELLER, C.L.; BECK, J.N.; YOUNG, J.C.; LANGLEY, M.P. Variations of heavy metals and arsenic in fish and other organisms from the Calcasien River and Lake, Louisiana. *Archives of Environmental Contamination Toxicology*, v.18, p.804-18, 1989.

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

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*, v.26, p. 613-9, 1993.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. R. L. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio. *BIOSCI J*, v. 21, p. 133–49, 2005.

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

RODRIGUES, L. Estudo de agrotóxicos usados em agricultura através da técnica de difração de raios X, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

ROHR, J. R.; MCCOY, K. A. A. Qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. *ENVIRON HEALTH PERSP*, v. 118, n. 1, p. 20–32, 2010.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H. Aspectos fiseoecológicos de *Astyanax fasciatus* e *Pimelodus maculatus* (Teleósteos) do reservatório da UHE de Furnas, MG: Avaliação morfofuncional das brânquias e variáveis hematológicas. Universidade Federal de São Carlos, 2008.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M.M; PAULINO, M.G.; FERNANDES M.N. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. ENVIRON MONIT ASSESS. v. 181 (1-4), p. 29–42, 2011.

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

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HAQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). ECOTOXICOL ENVIRON SAF, v. 56, p. 295–301, 2003.

SCHOTTLER, S.P.; EISENREICH, S.J.; CAPEL, P.D. Atrazine, alachlor and cyanazine in a large river system. ENVIRON SCI TECHNOL, v. 28, p. 1079-89, 1994.

SCHULZ, U. H.; MARTINS-JUNIOR, H. *Astyanax fasciatus* as bioindicator of water pollution of Rio dos Sinos, RS, Brazil. BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY v. 61, n. 4, p. 615–22, 2001.

SCOTT, G. R.; CLAIBORNE, J. B.; EDWARDS, S. L.; SCHULTE, P. M.; WOOD, C. M. Gene expression after freshwater transfer in gills and opercular epithelia of killifish: insight into divergent mechanisms of ion transport. J EXP BIOL, v. 208, n. 14, p. 2719–29, 2005.

SIES, H. Oxidative stress. London; Academic, p. 507, 1985.

SIES, H., JONES, D. Oxidative Stress, Encyclopedia of Stress, v. 2, p. 45-48, 2007.

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, v. 8, p. 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, v.78, p. 73-88, 2008.

SHEPHARD, K. L. Functions for fish mucus. FISH BIOLOGY AND FISHERIES, v. 4, p. 401–429, 1994.

SOLOMON, K. R.; BAKER, D. B.; RICHARDS, R. P.; DIXON, K. R.; KLAINE, S. J.; LA POINT, T. W.; KENDALL, R. J.; WEISSKOPF, C. P.; GIDDINGS, J. M.; GIESY, J. P.; HALL, L. W.; WILLIAMS, W. M. Ecological risk assessment of atrazine in north american surface waters. ENVIRON TOXICOL CHEM, v. 15, n. 1, p. 31–76, 1996.

- SOLOMON, K. R.; CARR, J. A.; PREEZ, L. H. D.; GIESY, J. P.; KENDALL, R. J.; SMITH, E. E.; VAN DER KRAKK, G. J. Effects of atrazine on fish, amphibians, and aquatic reptiles: a critical review. *CRITICAL REVIEWS IN TOXICOLOGY*, v. 38, n. 9, p. 721–72, 2008.
- SPADOTTO, C. A. Abordagem interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. *REVISTA NÚCLEO DE PESQUISA INTERDICLIPNAR*, São Manuel, p. 9, 2006.
- SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. DE. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. *JAGUARIÚNA: EMBRAPA MEIO AMBIENTE*, p. 29, 2004.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *BRAZ J MED BIOL RES*, v. 29, p. 1715–33, 1996.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *AQUATIC TOXICOL*, v. 37, p. 51-70, 1997.
- THIMBAULT, R. & R.J. SHULTZ. Reproductive adaptation among viviparous fishes (Cyprinodontiformes: Poeciliidae). *EVOLUTION*, v. 32 (2), p. 320-333, 1978.
- 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.
- VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *ECOTOXICOL ENVIRON SAF*, v. 64, p. 178–89, 2006.
- VASCONCELOS, F. C. W.; NÓBREGA, J. C. A.; GUERREIRO, M. C.; JESUS E. A.; JULIÃO, L. G. F.; CURI, N. Mobilidade do herbicida atrazina em amostras de solos vermelhos sob colagem e adubação fosfatada. *PESTICIDAS: R. ECOTOXICOL. E MEIO AMBIENTE*, CURITIBA, v. 18, p. 133–46, 2008.
- VITALE, A.M.; MONSERRAT, J.M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *COMPUT. BIOCHEM. PHYSIOL. C*, v. 122, p. 121–29, 1999.
- WASHINGTON, H.G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *WATER RESEARCH*, v.18, p.653-94, 1984.
- WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. *PHYSIOL REV*, v. 77, p. 591– 625,1997.
- WILSON, J. M.; LAURENT, P. Fish gill morphology: inside out. *J EXP ZOOL*, v. 293, n. 3, p. 192–213, 2002.

- 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*, v. 10, p. 347–354, 1991.
- WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. *AQUAT TOXICOL*, v.19, n.2, p.137-61, 1991.
- XING, H.; LI, S.; WANG, Z.; GAO, X.; XU, S.; WANG, X. Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. *CHEMOSPHERE*, v. 88, n. 4, p. 377–83, 2012.
- XING, H.; WANG, X; SUN, G; GAO, X.; XU, S.; WANG, X. Effects of atrazine and chlorpyrifos on activity and transcription of glutathione S-transferase in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *ENVIRON TOXICOL PHAR*, v. 33, n. 2, p. 233–44, 2012.
- YAMASHITA, M. G. N. Análise de rótulos e bulas de agrotóxicos segundo dados exigidos pela legislação federal de agrotóxicos e afins e de acordo com parâmetros de legibilidade tipográfica. Faculdade de Arquitetura, Artes e Comunicação, Universidade de São Paulo, Bauru, P. 108, 2008.
- YANG, W. K.; KANG, C. K.; CHEN, T. Y.; CHANG, W. B.; LEE, T. H. Salinity-dependent expression of the branchial Na⁺/K⁺ +/2Cl⁻ cotransporter and Na⁺/K⁺-ATPase in the sailfin molly correlates with hypoosmoregulatory endurance. *J COMP PHYSIOL B*, v. 181, n. 7, p. 953–64, 2011.
- ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática. Princípios e Aplicações*. São Carlos, Editora Rima, p. 478, 2006.
- ZBANYSZEK, R.; SMITH, L. S. Changes in carbonic anhydrase activity in coho salmon smolts resulting from physical training and transfer into seawater. *COMP BIOCHEM PHYSIOL*, v. 79, n. 2, p. 229–33, 1984.
- ZIMMER, A. M.; BARCAROLLI, I. F.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A. Waterborne copper exposure inhibits ammonia excretion and branchial carbonic anhydrase activity in euryhaline guppies acclimated to both fresh water and sea water. *AQUAT TOXICOL*, v. 122-123, p. 172–80, 2012.