

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA

**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS,
MORFOFUNCIONAIS, BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS EM CURIMBATÁS,
Prochilodus lineatus, (TELEOSTEI, PROCHILODONTIDAE) EXPOSTOS AO
FENANTRENO**

LARISSA PARREIRA ALVES MARTINS

São Carlos - SP

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE ZOOFISIOLOGIA E BIOQUÍMICA COMPARATIVA

**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS,
MORFOFUNCIONAIS, BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS EM CURIMBATÁS,
Prochilodus lineatus, (TELEOSTEI, PROCHILODONTIDAE) EXPOSTOS AO
FENANTRENO**

Orientada: Larissa Parreira Alves Martins

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde- Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos - SP

2012

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

M386ta

Martins, Larissa Parreira Alves.

Toxicidade e alterações hematológicas, morfofuncionais, bioquímicas e genéticas em curimatás, *Prochilodus lineatus*, (Teleostei, Prochilodontidae) expostos ao fenantreno / Larissa Parreira Alves Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

100 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Peixe. 2. Ecotoxicologia. 3. Curimatá (Peixe). 4. Brânquias. 5. Xenobiótica. 6. Rins. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

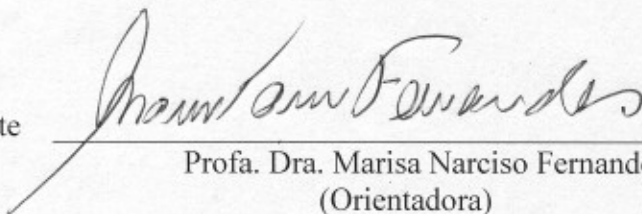
Larissa Parreira Alves Martins

**TOXICIDADE E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS, MORFOFUNCIONAIS,
BIOQUÍMICAS E GENÉTICAS EM CURIMBATÁS, *Prochilodus lineatus*,
(TELEOSTEI, PROCHILODONTIDAE) EXPOSTOS AO FENANTRENO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 30 de maio de 2012

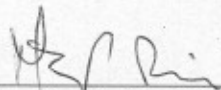
BANCA EXAMINADORA

Presidente 

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
(Orientadora)

1º Examinador 

Profa. Dra. Odete Rocha
PPGERN/UFSCar

2º Examinador 

Profa. Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva
Instituto de Pesca/São Paulo-SP

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa, pela orientação e aprendizado oferecidos durante estes dois anos, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da UFSCar e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

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

Ao CNPQ/INCT-TA, pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Gilberto Fillmann e à Dra. Patrícia Gomes Costa, do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO), do Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pelas análises do fenantreno na água.

Aos membros da banca pela disposição e interesse no trabalho.

A todos os amigos do laboratório: Eliane, Karla, Débora, Marcelo, Marise, Natália, Iara, Tayrine, Natieli, Bianca, Naiara, Flávia, Drielle, Vinícius, Talita, Priscila, Jade, Sharles, Jakeline e Edineide, pelo companheirismo e ajuda.

Aos Funcionários do LZBC: 'Dona' Vera, Carmem, 'Dona' Graça, 'Seu' Ângelo e Nadir, pela ajuda e companheirismo.

À Jakeline e à Edineide pela grande ajuda na realização do trabalho.

À Natieli, pela ajuda na realização da imunohistoquímica.

Ao Marcelo, Iara e Natália, pelos ensinamentos no início do mestrado.

À minha família, pelo apoio incondicional e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao Diego, pelo seu amor, companheirismo, incentivo e paciência, não só durante o tempo de realização do trabalho, mas nos últimos dez anos de minha vida.

Às minha amigas, Eliane, Karla e Débora, pelo apoio nos momentos mais difíceis, pela grande amizade construída que ficará para sempre e pelos momentos ótimos e inesquecíveis proporcionados em São Carlos.

A todos que, direta ou indiretamente me ajudaram na realização do trabalho.

À Deus pela vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O ecossistema aquático e sua contaminação	1
1.2 Contaminação do ecossistema aquático por derivados de petróleo	1
1.3 Contaminação do ecossistema aquático por fenantreno	2
1.4 O uso de peixes como biondicadores para o monitoramento ambiental	4
1.4.1 Brânquias	5
1.4.2 Rim	7
1.5 Biomarcadores em peixes	9
1.5.1 Biomarcadores bioquímicos	9
1.5.2 Biomarcadores osmo-iônicos	14
1.5.3 Biomarcadores morfológicos	15
1.5.4 Biomarcadores hematológicos	17
1.5.5 Biomarcadores genéticos	18
1.6 Espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	18
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Animais	21
3.2 Desenho experimental	21
3.2.1 CL50;96h	21
3.2.2 Testes subletais	22
3.3 Amostras de tecido	25
3.4 Análise das variáveis plasmáticas: íons e osmolaridade total	25
3.5 Análise das variáveis hematológicas	25
3.5.1 Hematócrito (Hct)	26
3.5.2 Dosagem de hemoglobina total ([Hb])	26
3.5.3 Contagem de eritrócitos (RBC)	26
3.5.4 Volume corpuscular médio (VCM)	26
3.5.5 Hemoglobina corpuscular média (HCM)	27
3.5.6 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)	27
3.5.7 Contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de trombócitos.....	27

3.6	Análise de genotoxicidade – micronúcleo e aberrações nucleares em eritrócitos	28
3.7	Análises morfofuncionais	29
3.7.1	Análise histopatológica em brânquias e rins	29
3.7.2	Imunohistoquímica de brânquias e rins	31
3.7.3	Determinação de densidade e área fracional de células-cloreto (CC) em brânquias.	32
3.8	Análises bioquímicas	33
3.8.1	Preparação dos homogeneizados	33
3.8.2	Proteínas dos homogeneizados de tecido	33
3.8.3	Atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (NKA) em brânquias e rins	33
3.8.4	Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) em brânquias e rins	34
3.8.5	Atividade das enzimas de estresse oxidativo em brânquias e rins	34
3.8.5.1	Superóxido dismutase total – SOD	34
3.8.5.2	Catalase – CAT	35
3.8.5.3	Glutaciona peroxidase – GPx	35
3.8.5.4	Glutaciona reduzida – GSH	35
3.8.5.5	Glutaciona s- transferase – GST	36
3.8.6	Peroxidação lipídica	36
3.9	Análise estatística	36
4.	RESULTADOS	37
4.1	Teste de toxicidade aguda – CL50; 96h	37
4.2	Exposição subletal	38
4.2.1	Osmolalidade e íons plasmáticos	39
4.2.2	Variáveis hematológicas	40
4.2.3	Variáveis genotóxicas – micronúcleo e aberrações nucleares em eritrócitos	45
4.2.4	Variáveis morfológicas	47
4.2.4.1	Histopatologia de brânquias e rins	47
4.2.4.2	Imunohistoquímica de brânquias e rins	55
4.2.4.3	Densidade e área fracional de células-cloreto (CC) em brânquias	58
4.2.5	Variáveis bioquímicas	61
4.2.5.1	Atividade da enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (NKA) em brânquias e rins	61
4.2.5.2	Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) em brânquias e rins	63
4.2.5.3	Atividade das enzimas de estresse oxidativo em brânquias e rins	65
4.2.5.3.1	Superóxido dismutase total – SOD	65
4.2.5.3.2	Catalase – CAT	67
4.2.5.3.3	Glutaciona peroxidase – GPx	69

4.2.5.3.4 Glutathiona reduzida – GSH	71
4.2.5.3.5 Glutathiona s- transferase – GST	73
4.2.5.4 Peroxidação lipídica – LPO	75
5. DISCUSSÃO	77
5.1 Concentração letal 50% fenatreno em <i>P.lineatus</i>	77
5.2 Respostas genotóxicas, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de <i>P. lineatus</i> após exposição subletal	78
6. CONCLUSÃO	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

EQUAÇÕES

Equação 1. Desintoxicação do radical superóxido (O_2) pela enzima superóxido dismutase (SOD)	10
Equação 2. Transformação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela enzima catalase (CAT).....	11
Equação 3. Eliminação de EROs pela GPx utilizando o tripeptídeo glutationa (GSH) como agente redutor	11
Equação 4. Conjugação da GSH com o substrato eletrofilico tóxico (xenobiótico) pela ação glutationa S-transferase (GST)	11
Equação 5. Equação utilizada para o cálculo do volume corpuscular médio (VCM), expresso em μm^3	27
Equação 6. Equação utilizada para cálculo da hemoglobina corpuscular média (HCM), expressa em $pg.cel^{-1}$	27
Equação 7. Equação utilizada para cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), expressa em $g.dL^{-1}$	27
Equação 8. Equação utilizada para cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH)	29
Equação 9. Equação utilizada para cálculo da Área Fracional de Células-Cloreto (AFCC), expressa em %	32
Equação 10. Equação utilizada para cálculo da Densidade de Células- Cloreto (AFCC), expressa em número de células por mm^2	32

FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do fenantreno	3
Figura 2. Estruturas químicas dos contaminantes considerados prioritários pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE)	3
Figura 3. Estrutura branquial de teleósteos	6
Figura 4. Fotomicrografia mostrando os principais tipos celulares nas lamelas e filamento de teleósteos	7
Figura 5. Localização do rim em peixes teleósteos	8
Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de defesa antioxidante, enzimático e	

não enzimático	12
Figura 7. Esquema do funcionamento da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	13
Figura 8. Representação esquemática geral do transporte de íons realizado pelas enzimas Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e anidrase carbônica no epitélio de brânquias e rins de peixes de água doce...	14
Figura 9. Esquema das lesões branquiais mais comuns de acordo com levantamento realizado por MALLAT (1985)	16
Figura 10. Exemplar de curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i>	18
Figura 11. Etapas extração em fase sólida	23
Figura 12. Cromatograma no modo FullScan com os tempos de retenção e íons característicos representativos dos padrões externos de HPAs (500 ng mL ⁻¹)	24
Figura 13. Cromatograma no modo FullScan com os tempos de retenção e íons característicos dos padrões internos, padrão surrogate e interferentes representativos de um branco analítico	24
Figura 14. Demonstração dos tipos de aberrações nucleares e dos micronúcleos observados na análise de genotoxicidade	28
Figura 15. Porcentagem de Mortalidade de <i>P. lineatus</i> (n=3 em cada concentração) exposto ao fenantreno. Os gráficos de pizza indicam, no sentido horário, a porcentagem de mortalidade cumulativa durante a exposição ao fenantreno a cada 24 horas	37
Figura 16. Relação entre concentração de fenantreno e mortalidade, para determinação da CL50;96 horas do composto para <i>P. lineatus</i>	38
Figura 17. Variáveis hematológicas de <i>P. lineatus</i> expostos ao fenantreno durante 24 horas ...	41
Figura 18. Variáveis hematológicas de <i>P. lineatus</i> expostos ao fenantreno durante 96 horas ...	42
Figura 19. Células Sanguíneas de <i>P. lineatus</i>	45
Figura 20. Variáveis genotóxicas	47
Figura 21. Fotomicrografia de brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a diferentes concentrações de fenantreno	48
Figura 22. Valor Médio de Alteração (VMA) e Índice de Alteração Histopatológica (IAH) em brânquias e rins de <i>Prochilodus lineatus</i>	53
Figura 23. Fotomicrografia do rim de <i>P. lineatus</i> do grupo controle	54
Figura 24. Fotomicrografia do rim de <i>P. lineatus</i> expostos a diferentes concentrações de fenantreno	55
Figura 25. Fotomicrografias mostrando as células-cloreto branquiais e renais coradas através da imunohistoquímica contra Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	57

Figura 26. Número de células-cloreto observadas em brânquias e rins através de imunohistoquímica contra Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	58
Figura 27. Densidade e área fracional de células-cloreto encontradas em brânquias através de microscopia eletrônica de varredura	60
Figura 28. Eletromicrografias de varredura da superfície do epitélio do filamento branquial de <i>Prochilodus lineatus</i>	61
Figura 29. Atividade específica da Na ⁺ /K ⁺ ATPase ($\mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	62
Figura 30. Atividade da anidrase carbônica (U mg Pt^{-1}) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	64
Figura 31. Atividade da superóxido dismutase ($\text{U SOD min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	66
Figura 32. Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	68
Figura 33. Atividade da glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	70
Figura 34. Concentrações de dissulfeto de glutathiona ($\mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	72
Figura 35. Atividade da glutathiona s- transferase ($\text{nmol CDNB min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	74
Figura 36. Concentrações de hidroperóxido de cumeno ($\mu\text{mol CHP.mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de <i>P. lineatus</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tipos de histopatologias analisadas nas brânquias e rins de <i>Prochilodus lineatus</i> e seus respectivos estágios de severidade	30
Tabela 2. Concentrações reais de fenantreno na água dos aquários em teste em $\mu\text{g.L}^{-1}$	38
Tabela 3. Osmolalidade e concentração plasmática dos íons Na^+ , Cl^- e K^+ em <i>P. lineatus</i> expostos a 10, 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno durante 24 e 96 h	39
Tabela 4. Valores médios de leucócitos e trombócitos (número. $10^3 \pm$ erro-padrão da media) de <i>P. lineatus</i> do grupo controle e expostos ao fenantreno durante 24 e 96 horas	43
Tabela 5. Porcentagem média na contagem diferencial de leucócitos (\pm erro padrão da média) do sangue de <i>P. lineatus</i> do grupo controle e expostos ao fenantreno durante 24 e 96 horas	44
Tabela 6. Aberrações nucleares e micronúcleos eritrocitários por mil células ($\% \pm$ erro padrão da média) no sangue de <i>Prochilodus lineatus</i> do grupo controle expostos ao fenantreno durante 24 e 96 horas	46
Tabela 7. Frequências de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de <i>Prochilodus lineatus</i> no grupo controle e expostos ao fenantreno por 24 e 96 horas	49

RESUMO

Estudos recentes têm mostrado que, a partir de 1990, houve um aumento abrupto e substancial das concentrações de fenantreno no ambiente aquático, em consequência, principalmente, do aumento das atividades com derivados de petróleo. Neste estudo foi determinada a toxicidade aguda (CL50;96 h) do fenantreno para a espécie *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) e investigado o seu efeito sobre as brânquias e rins posteriores desta espécie quando exposta a concentrações subletais (correspondentes a 1/100, 1/50 e 1/5 da CL50;96h) durante 24 e 96 h, utilizando biomarcadores bioquímicos, morfológicos, osmo-iônicos, hematológicos e genéticos. Após os períodos experimentais, amostras de sangue foram obtidas, via punção caudal, para análise de variáveis plasmáticas, hematológicas e genotóxicas, e amostras de brânquias e rins foram coletadas e fixadas para análises morfológicas ou congeladas para análise bioquímica. O fenantreno pode ser considerado moderadamente tóxico para o *P. lineatus*, pois a CL50;96h estimada foi 1,013 mg.L⁻¹. A exposição subletal ao fenantreno na concentração de 200 µg.L⁻¹ (CL50/5), principalmente no período de 96 horas, provocou alterações significativas nos parâmetros morfológicos, bioquímicos, genotóxicos, osmo-iônicos e hematológicos. As alterações osmo-iônicas (aumento da osmolalidade e do íon Na⁺, e íon Cl⁻ sem variação) sugeriram um desequilíbrio osmo-iônico, o qual foi confirmado com os resultados observados na atividade das enzimas envolvidas na osmorregulação (NKA e AC) em brânquias e rins (aumento da NKA em brânquias e rins, e aumento da AC nos rins), e com as alterações no número de células-cloreto principalmente nos rins, os quais apresentaram um aumento. Além disso, ocorreram alterações histopatológicas branquiais e renais. As respostas hematológicas evidenciaram uma tentativa do organismo de melhorar a captação de oxigênio nas brânquias, além de respostas a processos inflamatórios provocados pelo contaminante. Quanto as enzimas de estresse oxidativo analisadas, tanto a inibição nas enzimas CAT e SOD, quanto a não alteração dos mecanismos das GPx, GST e GSH nas brânquias destes animais, levaram a um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes e então a uma peroxidação lipídica. Em conclusão, as alterações observadas podem provocar efeitos adversos à saúde dos animais deste grupo (200 µg.L⁻¹) de modo que, ocorrerá um desvio energético para restaurar as condições normais do organismo 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 conseqüentemente a mortalidade dos indivíduos.

ABSTRACT

Recent studies have shown that since 1990, there was an abrupt and substantial increase in the concentrations of phenanthrene in the aquatic environment, due mainly to the increase of activities including petroleum derivatives. This study determined the acute toxicity (LC50;96h) of phenanthrene to *Prochilodus lineatus* and investigated its effects on gills and kidneys of this species when exposed to sublethal concentrations of phenanthrene (corresponding to 1/100 to 1/50 and 1/5 of LC50;96h) for 24 and 96h, using biochemical, morphological, osmo-ionic, hematological and genetics biomarkers. After the experimental periods, blood samples were obtained via caudal puncture for analysis of plasma, haematological and genetics variables, and samples of gills and kidneys were collected and fixed for morphological analysis or frozen for biochemical analysis. Phenanthrene can be considered moderately toxic to *P. lineatus* because the estimated LC50;96h was 1.013 mg L⁻¹. Sublethal exposure to phenanthrene (200µg.L⁻¹; LC50/5), especially after 96 hours, caused significant changes in almost all parameters: morphological, biochemical, genotoxic, osmo-ionic and hematological. The osmo-ionic changes (increase of osmolality and ion Na⁺, and no variation of ion Cl⁻) suggested a osmo-ionic unbalance, which was confirmed by the results observed in the activity of enzymes involved in osmoregulation (NKA and AC) on gills and kidneys (increase of NKA in gills and kidneys, and increase of AC in kidneys), and also by the changes in the number of chloride cells mainly in kidneys, which showed an increase. Furthermore, histopathological changes were found in the gills and kidneys. The responses of the hematological variables evidenced an attempt to improve the oxygen uptake by the gills and inflammatory processes caused by the contaminant. In the enzymes of oxidative stress analyzed, both the inhibition in CAT and SOD activities, and the lack of changing in mechanisms of GPx, GSH and GST in the gills of these animals, led to an unbalance between the antioxidants and pro-oxidant levels and then, a lipid peroxidation. In conclusion, the changes observed in these animals (200µg.L⁻¹) can have adverse effects on your health, once there will be an energetic deviation to restore the normal conditions of the organism, to detriment of other functions such as growth and reproduction, besides the possibility of exhaustion occurs in these animals if environment remain contaminated, thereby increasing the risk of disease and thus the mortality in these individuals.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O ecossistema aquático e sua contaminação

A contaminação dos ecossistemas aquáticos, um dos problemas ambientais mais importantes da atualidade, é, em geral, provocada pela interferência humana de forma intencional ou acidental e ocorre principalmente através de despejos de efluentes industriais, domésticos e agrícolas (MANSON, 1996).

As diferentes atividades antrópicas realizadas próximas aos corpos de água geram resíduos que resultam em diferentes tipos de poluição, pontual e aguda ou crônica e difusa, alterando a estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos (REBOUÇAS, 1999). As fontes de poluição difusas se caracterizam por serem de difícil identificação e quantificação, uma vez que são representadas pelos escoamentos urbanos e agrícolas e precipitação atmosférica, enquanto que as fontes de poluição pontuais são de fácil identificação e quantificação, sendo representadas pelos despejos de esgotos domésticos e industriais diretamente nos corpos de água (LLOYD, 1992; FRACÁCIO, 2006).

Uma vez lançados nos ambientes aquáticos, os compostos tóxicos podem interagir diretamente com a biota por ingestão e contato, ou se depositar nos sedimentos. Assim, este compartimento pode funcionar como um sumidouro temporário de poluentes os quais, sob determinadas condições ambientais, podem ser liberados para a coluna de água afetando assim não só a fauna bentônica, mas também os organismos nectônicos (BAUDO e MUNTAU, 1990; FRACÁCIO, 2006).

1.2 Contaminação do ecossistema aquático por derivados de petróleo

Dentre os diferentes tipos de poluentes, os derivados de petróleo são alguns dos mais relevantes para a ecotoxicologia aquática (PACHECO e SANTOS, 2001a), uma vez que tem elevado potencial poluidor e a frequência dos eventos de derrames tem aumentado nos últimos anos (SIMONATO, 2006).

A entrada de petróleo e derivados no ambiente aquático é atribuída principalmente a acidentes com tanques de armazenamento, a grandes derramamentos e descargas de resíduos municipais e industriais. Deste modo, os componentes do petróleo e de seus derivados podem atingir os rios e outros ecossistemas aquáticos, por isso a investigação dos efeitos tóxicos desses contaminantes em organismos aquáticos é de extrema importância (PACHECO e SANTOS, 2001b; SIMONATO, 2006).

O petróleo e seus derivados podem promover sérios distúrbios nos ecossistemas aquáticos uma vez que suas frações solúveis em água (FSA) podem alcançar águas naturais, tornando-se biologicamente disponíveis aos organismos aquáticos. Componentes presentes nas FSA do petróleo e seus derivados, como os hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos do grupo BTEX (benzeno, tolueno, etil benzeno e xileno) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), são tóxicos e potencialmente mutagênicos e/ou carcinogênicos (KHAN, 1998; TELES et al., 2003), assim estudos para a avaliação dos efeitos da poluição por esses compostos se mostram muito necessários (ZHANG et al., 2003; SIMONATO, 2006)

Especificamente, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são compostos orgânicos, lipofílicos, que apresentam dois ou mais anéis carbônicos fundidos e podem ser formados por meio de fontes biogênicas como incêndios florestais naturais, afloramentos de petróleo, erupções vulcânicas e sínteses biológicas, porém é de fontes antrópicas que ocorrem as formas mais significativas de contaminação ambiental, incluindo descartes de origem doméstica e industrial (NAVARRO LINS, 2010). Segundo Neff (1979), os HPAs antropogênicos tem como fontes principais as atividades de incineração de resíduos; queimadas de campos e florestas; geração de energia via queima de combustíveis fósseis; emissão de motores de veículos movidos a combustíveis fósseis; fumo e incêndios (PUC – RIO, 2011).

Sabe-se que a exposição de peixes aos hidrocarbonetos do petróleo pode gerar interferências no sistema reprodutor e anormalidades durante o desenvolvimento de embriões e larvas de peixes (KNUTZEN, 1995; MIDDAUGH et al., 1998; CARLS et al., 1999), alterações nas funções cardíacas, respiratórias e comportamentais (WIDDOWS e JOHNSON, 1988), efeitos imunotóxicos (FOSSI et al., 1997), genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (COLLIER et al., 1998; CARLS et al., 1999; BARSINIÉ et al., 2007; VANZELLA et al., 2007), além de lesões histopatológicas nos sistemas respiratório, digestório e excretor (HSU e DENG, 1996; LEE e PAGE, 1997; BRAND et al., 2001; AKAISHI et al., 2004; SIMONATO et al., 2008; NAVARRO LINS, 2010).

1.3 Contaminação do ecossistema aquático por fenantreno

Especificamente o fenantreno, um HPA com três anéis aromáticos (Figura 1), fórmula química $C_{14}H_{10}$ e peso molecular de $178,22 \text{ g.mol}^{-1}$, existe como um sólido cristalino incolor, tem caráter hidrofóbico e lipofílico (ANTÓN e LISAZO, 2001) e entre 16 outros HPAs (Figura 2), é considerado como contaminante prioritário pela Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE) em função de seus efeitos carcinogênicos (CAVRET e FEIDT, 2005).

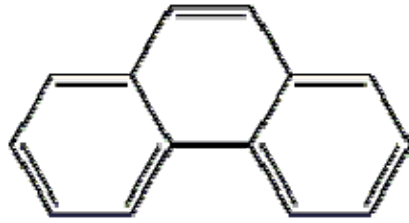


Figura 1. Estrutura química do fenantreno.

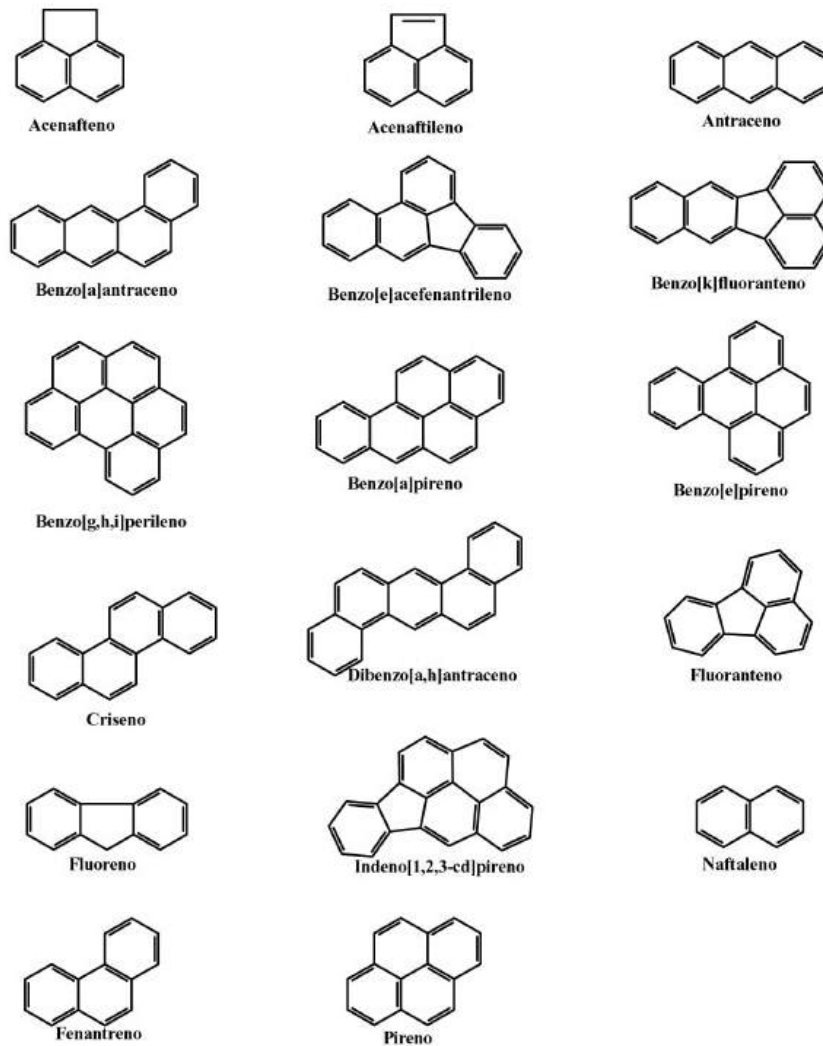


Figura 2. Estruturas químicas dos contaminantes considerados prioritários pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pela Comunidade Econômica Européia (CEE).

O escoamento da água contaminada, a deposição atmosférica e os derrames de petróleo são as maiores fontes de contaminação aquática pelo fenantreno (LIMA et al., 2003; INCARDONA et

al., 2005). Estudos recentes têm mostrado que as entradas de fenantreno no ambiente manteve-se constante de 1980 até 1990, quando um aumento abrupto e substancial das concentrações foram observadas, em consequência, principalmente, do aumento das atividades poluidoras (LIMA et al., 2003). As concentrações de fenantreno em áreas poluídas podem variar de $14,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (VRANA et al., 2001) a $1460 \mu\text{g.L}^{-1}$ (ANYAKORA et al., 2005) em áreas de exploração de petróleo, onde níveis consideráveis também podem ser detectados em organismos aquáticos, principalmente peixes (HELLOU e WARREN, 1997; OLIVEIRA et al., 2007).

Apesar da presença do fenantreno nos ambientes aquáticos, existe pouca informação disponível sobre sua toxicidade em peixes, principalmente em peixes de água doce. JEE et al. (2004) e JEE e KANG (2003) relataram o retardo no crescimento, alterações hematológicas e na atividade da acetilcolinesterase como efeitos tóxicos do fenantreno presente em *Paralichthys olivaceus*. A CL₅₀;96 h para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi estimada em $0,94 \text{ mg.L}^{-1}$ ($0,91 \text{ mg.L}^{-1}$ a $0,97$, intervalo de confiança de 95%) de fenantreno (VEINTEMILLA, 2006).

1.4 O uso de peixes como bioindicadores para o monitoramento ambiental

A avaliação de bioindicadores é utilizada como técnica de monitoramento ambiental, uma vez que acrescenta informações a respeito da resposta biológica que aquele determinado ambiente apresenta na presença desses poluentes (UNEP, 1991; WHO, 1996). O termo bioindicador pode ser definido como espécies sentinelas que são utilizadas como primeiros indicadores de efeito da contaminação de seu habitat (ADAMS, 2002; NAVARRO LINS, 2010).

No ambiente aquático, plantas aquáticas, algas, crustáceos, moluscos, peixes, mamíferos, aves, entre outros, podem ser alvos de estudos, portanto são considerados bioindicadores. Ao escolher um bioindicador ideal, devem ser observadas algumas características importantes de acordo com o estudo que será desenvolvido, como por exemplo, a sobrevivência do bioindicador em ambientes saudáveis, mas também resistência relativa ao contaminante que está exposto. Outros aspectos que podem facilitar o desenvolvimento de um estudo são a abundância dessa espécie no ambiente e a facilidade em adaptar-se aos ensaios laboratoriais (AKAISHI, 2004). Organismos pertencentes ao topo da cadeia alimentar, como os peixes, são comumente utilizados por possuírem intrínseca relação com toda a cadeia inferior, indicando respostas de efeitos crônicos, acumulativos e persistentes no nível de cadeia, além de efeitos diretos no nível do indivíduo (NAVARRO LINS, 2010).

A utilização de invertebrados no monitoramento ambiental é muito comum por serem componentes majoritários dos ecossistemas e apresentarem abundância populacional (MARTINEZ

et al., 1992; PÉQUEUX, 1995) entretanto, o número de estudos em que peixes são utilizados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos tem aumentado consideravelmente (OVERSTREET, 1988; TEH et al., 1997; SCHWAIGER et al., 1997; GUNDERSEN et al., 2000; PACHECO e SANTOS, 2002; THOPHON et al., 2003; BARCAROLLI e MARTINEZ, 2004). Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (VAZZOLER, 1996; LOWE-MC CONNELL, 1999) e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros, são a principal fonte de proteínas da população (SILVA FILHO et al., 2000; SILVA, 2004).

Deste modo, vários trabalhos fazem uso destes animais para avaliar o efeito do estresse causado por variações no ambiente aquático (OVERSTREET, 1988; TEH et al., 1997; GUNDERSEN et al., 2000; SCHWAIGER, 2001), entretanto, ainda assim são poucos os trabalhos com espécies neotropicais (AMEIDA, 2001; SILVA, 2001; WINKALER, 2001; WINKALER et al., 2001; MARTINEZ e CÓLUS, 2002; BARCAROLLI e MARTINEZ, 2004; SILVA, 2004).

O uso dos peixes como bioindicadores não se restringe apenas na avaliação do número e abundâncias de espécies no ambiente, mas pode se basear também em uma análise detalhada das condições de saúde da espécie, via biomarcadores. Para isto, a escolha dos órgãos que serão alvos de estudo é crucial para a relevância dos dados obtidos. Órgãos de contato direto com o agente tóxico, como as brânquias, e órgãos de metabolismo e excreção de xenobióticos em contato com grande fluxo sanguíneo, como o rim, podem indicar alterações de ação tóxica aguda ou crônica desses agentes em tecidos animais (NAVARRO LINS, 2010).

1.4.1 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 e 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 (SILVA, 2004).

Nos teleósteos, as brânquias são formadas por oito arcos branquiais dispostos quatro a quatro lateralmente na cavidade orofaríngea protegida e separada do meio externo pelo opérculo (Figura 3a). De cada arco branquial estendem-se duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias, e acima e abaixo destes filamentos, a intervalos regulares, elevam-se as lamelas secundárias que são os sítios de trocas gasosas (MALLATT, 1985; TAKASHIMA e HIBIYA,

1995) (Figura 3b). Nas brânquias o sangue flui na lamela em direção oposta àquela da água, através de um plexo formado pelas células pilares. Este fluxo contracorrente ajuda na utilização eficiente do oxigênio, pois o sangue que abandona as lamelas está em íntimo contato com a água que apresenta máxima tensão de oxigênio e mínima tensão de dióxido de carbono (SCHMIDT–NIELSEN, 1996; HEATH, 1987; SILVA, 2004) (Figura 3c).

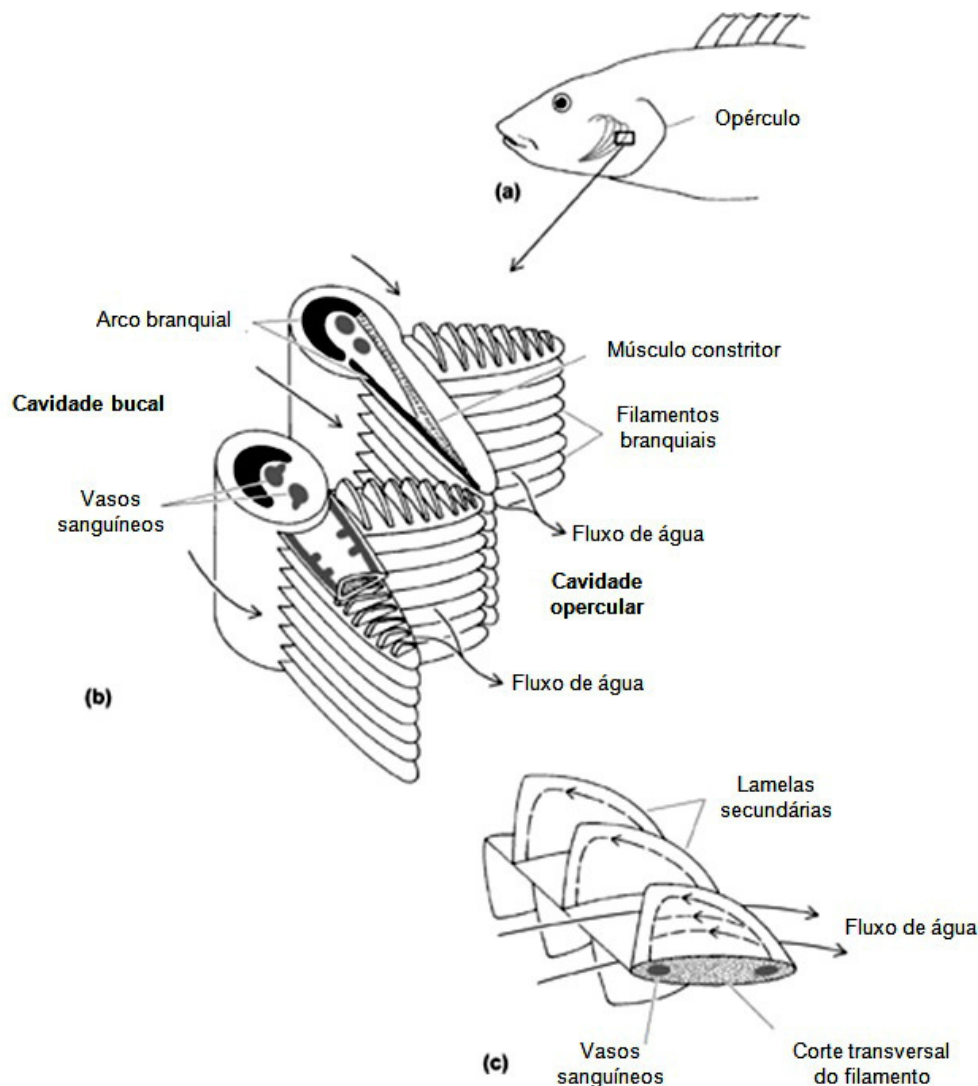


Figura 3. Estrutura branquial de teleostes. **a)** Localização das brânquias; **b)** e **c)** Ampliação dos arcos branquiais, filamentos e lamelas (Extraído de PAULINO, 2011, adaptado e traduzido de HIROSE et al., 2003).

Os tipos celulares que constituem o epitélio do filamento da região basal até a sua superfície são as células indiferenciadas, neuroepiteliais, células-cloreto, células mucosas e células pavimentosas (Figura 4).

As lamelas são constituídas de duas camadas de células, a camada externa, em contato com a água, que consiste de células pavimentosas (CPV) e a camada interna que consiste em células

indiferenciadas (Ci) (MORON et al., 2009) que recobrem as células pilares (CPi) que são responsáveis pela sustentação e formação de espaços por onde o sangue atravessa a lamela (PAULINO, 2011) (Figura 4).

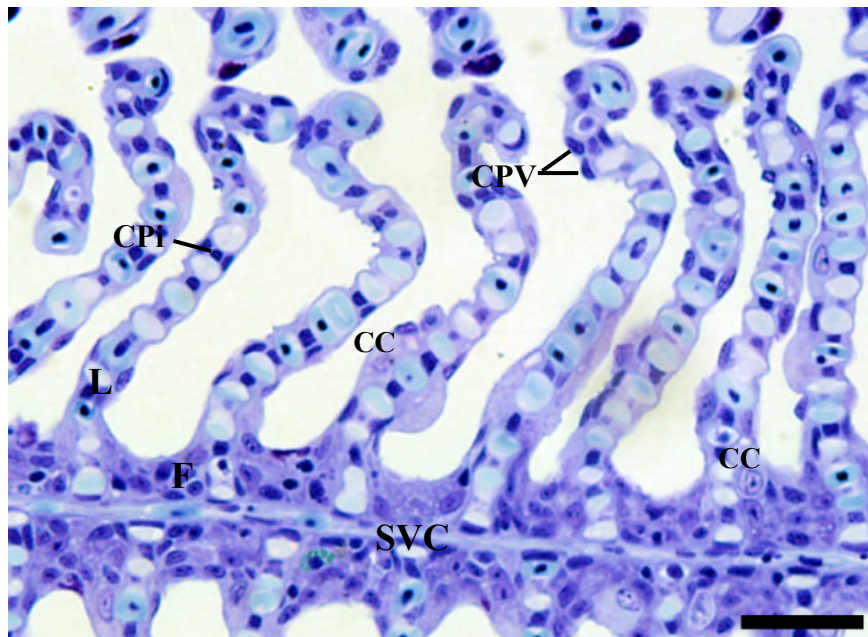


Figura 4. Fotomicrografia mostrando os principais tipos celulares nas lamelas e filamento de teleosteos, CPi = células pilares; CPV = células pavimentosas; CC = células-cloreto; SVC = seio venoso central; F= filamento; L = lamela. Coloração: Azul de Toluidina. Barra de escala: 20 μ m.

As células-cloreto (CC), ou células ricas em mitocôndrias, estão presentes principalmente no epitélio do filamento e são consideradas os locais primários de absorção ativa dos íons sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{2+}) em peixes de água doce e de secreção ativa do cloreto de sódio (NaCl) nos teleosteos marinhos. Em algumas condições ambientais, elas podem estar presentes nas lamelas de algumas espécies (EVANS et al., 2005; PAULINO, 2011).

1.4.2 Rim

O rim dos peixes teleosteos localiza-se dorsalmente, junto da coluna vertebral, e é dividido em duas porções: anterior ou rim cefálico e a porção posterior (Figura 5). O rim anterior está integrado ao sistema endócrino, é homóloga a adrenal de mamíferos e apresenta dois tipos especiais de células, as células interrenais e as células cromafins, sendo assim muito importante na resposta ao estresse, mediada pelo eixo hipotálamo-hipófise-célula interrenal e pelo eixo hipotálamo sistema nervoso simpático-tecido cromafim (WENDELAAR BONGA, 1997; SILVA, 2004).

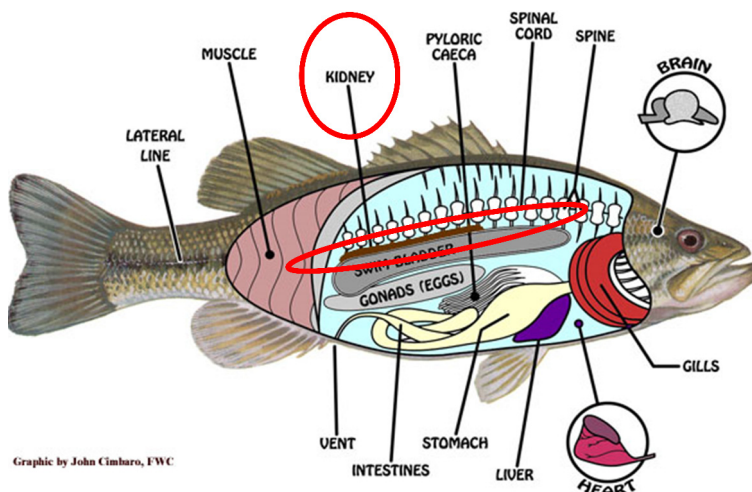


Figura 5. Localização do rim em peixes teleósteos (CIMBARO, 2011).

Em teleósteos, o rim posterior é, juntamente com o intestino e brânquias, responsável pela excreção e manutenção da homeostasia dos fluidos corporais (EVANS, 1993). Além disso, através da produção de urina, atua fornecendo uma rota de excreção de metabólitos de diversos xenobióticos aos quais os peixes são frequentemente expostos. Assim, considerando que um grande volume de sangue flui através do rim, lesões encontradas nesse órgão podem ser úteis como indicadores de poluição (PAMPLONA, 2009).

A estrutura morfológica do rim posterior dos teleósteos é em geral, caracterizada por apresentar néfrons com corpúsculo renal (glomérulo e cápsula de Bowman) e túbulos renais. O túbulo renal é dividido em duas porções uma proximal e uma distal. No segmento proximal, o epitélio tubular é composto por células cubóides com microvilosidades na membrana apical, que é reconhecida, neste caso, como borda em escova, enquanto no segmento distal, as células epiteliais não são providas de microvilos e não apresentam borda em escova. Os glomérulos são desenvolvidos e ricamente vascularizados, juntamente com túbulos proximal e distal, túbulos e ductos coletores (GROMAN, 1982; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; JOBLING, 1995; EVANS, 1993; SILVA, 2004).

Os rins de teleósteos são um dos primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes (THOPHON et al., 2003), uma vez que por ser um órgão altamente dinâmico, qualquer substância na circulação sistêmica alcança, em taxa relativamente alta este órgão. Deste modo, uma substância não-tóxica no plasma, pode se tornar tóxica no rim (BANERJEE e BHATTACHARYA, 1994; PAMPLONA, 2009).

As alterações mais comumente encontradas em rins de teleósteos são degenerações tubulares, e alterações no corpúsculo, como dilatação dos capilares no glomérulo e redução do espaço de Bowman (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995; (PAMPLONA, 2009).

1.5 Biomarcadores em peixes

De acordo com Decaprio (1997), um biomarcador pode ser definido como um indicador biológico que evidencia efeito resultante de exposição a um estressor, que pode ser interpretado como evento adaptativo não patogênico ou como alteração de um evento funcional, dependendo da toxicocinética e do mecanismo de ação do estressor (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Considerando que os efeitos de contaminantes, como o fenantreno, podem se manifestar em vários níveis de organização, um grande número de biomarcadores relacionados à exposição a poluentes tem sido proposto para avaliar a saúde dos peixes (ADAMS et al., 1990; VAN DER OOST et al., 2003) como biomarcadores bioquímicos, endócrinos, metabólicos, hematológicos, fisiológicos e histopatológicos (SIMONATO, 2006).

1.5.1 Biomarcadores bioquímicos

Considerando que alterações moleculares e bioquímicas decorrentes da exposição a agentes tóxicos tendem a ser mais sensíveis e mais altamente conservados do que parâmetros determinados ao nível orgânico, vários parâmetros bioquímicos têm sido utilizados como biomarcadores em peixes (ADAMS et al., 1990). Dentre os biomarcadores bioquímicos, os mais investigados são as enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, ou seja, as enzimas de biotransformação e de defesa antioxidante (VAN DER OOST et al., 2003; SIMONATO 2006).

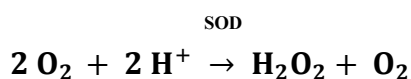
As reações envolvidas no metabolismo ou biotransformação (detoxificação) destas substâncias incluem duas fases. A fase inicial ou fase I, freqüentemente oxidativa, ocorre quando um grupamento funcional polar é introduzido no contaminante lipofílico, tornando-o mais hidrofílico. Na fase II os metabólitos produzidos na fase I são conjugados com compostos endógenos de ocorrência comum nas células, formando um metabólito secundário. Um importante aspecto desta reação é a conversão de compostos lipofílicos em compostos hidrofílicos, que assim se tornam metabólitos excretáveis. No entanto, os metabólitos produzidos na fase I, podem gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) extremamente tóxicas ao organismo (DI GIULIO et al., 1995; LANDIS e YU, 1995; VAN DER OOST et al., 2003; SIMONATO, 2006).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são compostos formados por oxigênio que apresentam alta reatividade, podendo ser radicais, quando o átomo de oxigênio sozinho ou associado a outro elemento possui um ou mais elétrons desemparelhados como no caso da hidroxila (HO.), superóxido (O₂⁻), peroxila (ROO.) e alcoxila (RO.), ou por espécies não radicalares, como o oxigênio singlet (1O₂) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que mesmo não sendo radicais livres, possuem alta reatividade (SIES, 1985; HALLIWELL e GUTERIDGE, 2005; BERGENDI et al., 1999; RIBEIRO et al. 2005; AZEVEDO, 2011).

Para conter os danos oxidativos causados pelas ERO, os organismos aeróbicos desenvolveram adaptações, as quais são divididas em três níveis: prevenção da formação das ERO, eliminação das ERO formadas e reparo das moléculas modificadas por ERO (STOREY, 1996; RIBEIRO et al. 2005). Dentre os níveis de adaptação, se destacam os mecanismos de eliminação das ERO, 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) (AZEVEDO, 2011).

Entre os mecanismos enzimáticos destacam-se as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathiona peroxidase (GPx) e enzima de biotransformação glutathiona S-transferase (GST), enquanto que, entre os sistemas não enzimáticos destacam-se o dissulfeto de glutathiona (GSH), e vitaminas A, C e E (SCHLENK et al., 1999).

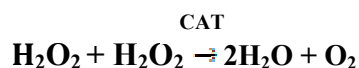
A SOD é a principal e primeira defesa contra o radical superóxido, pois ela cataliza a reação espontânea de dismutação do radical superóxido (FRIDOVICH, 1997). A família da SOD possui quatro diferentes enzimas: duas formas de cobre-zinco SOD, a manganês-SOD e a ferro-SOD, que se diferenciam principalmente pelo ligante metálico e a localização nas células (HERMES-LIMA, 2004), porém todas agem da mesma forma (MONTEIRO, 2010; AZEVEDO, 2011; PAULINO, 2011), como apresentada na equação 1.



Equação 1. Transformação do radical superóxido (O₂) pela enzima superóxido dismutase (SOD).

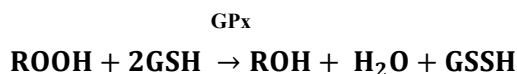
A CAT é uma hemeproteína citoplasmática que catalisa a redução do H₂O₂ em H₂O e O₂ e por isso considerada um dos principais componentes de defesa antioxidante primária (GAETANI et al., 1989). De acordo com Scandalios (2005), a redução do peróxido de hidrogênio pela CAT requer altas concentrações de H₂O₂, atuando como um suporte para o sistema glutathiona dependente, ou

seja, em baixas concentrações, os peróxidos seriam eliminados pela GPx e em altas concentrações pela CAT (PAULINO, 2011).



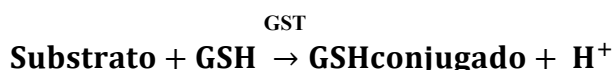
Equação 2. Transformação do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela enzima catalase (CAT).

A GPx é uma enzima selênio-dependente, responsável também pela eliminação do peróxido de hidrogênio, além da eliminação de hidroperóxidos orgânicos, bem como de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH). As reações de eliminação de ERO catalisadas pela GPx têm como agente redutor o tripeptídeo glutationa (GSH) (HERMES-LIMA, 2004; AZEVEDO, 2011), como pode ser observado na equação 2.



Equação 3. Eliminação de EROs pela GPx utilizando o tripeptídeo glutationa (GSH) como agente redutor.

A GST é uma família de isoenzimas cuja atividade pode reduzir ou evitar que ocorra o estresse oxidativo devido a metabolização de uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, por meio da conjugação desta com a GSH que formam conjugados solúveis em água facilitando a excreção desses substratos (VAN DER OOST et al., 2003; PAULINO, 2011), como demonstrado na equação 3.



Equação 4. Conjugação da GSH com o substrato eletrofílico tóxico (xenobiótico) pela ação glutationa S-transferase (GST).

A GPx e a GST dependem da GSH, portanto a GSH desempenha um papel em vários processos celulares, sendo o principal composto envolvido no mecanismo de defesa antioxidante não enzimático. Após a sua utilização, os níveis de GSH no organismo são renovados por dois processos: pela conversão da glutationa oxidada (GSSH) em GSH através da GR ou através da produção de novas moléculas de GSH, as quais são sintetizadas nas células pela ação consecutiva de duas enzimas dependentes de ATP (MAHER, 2005; AZEVEDO, 2011).

A ação integrada desses agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos estão representadas na figura 6.

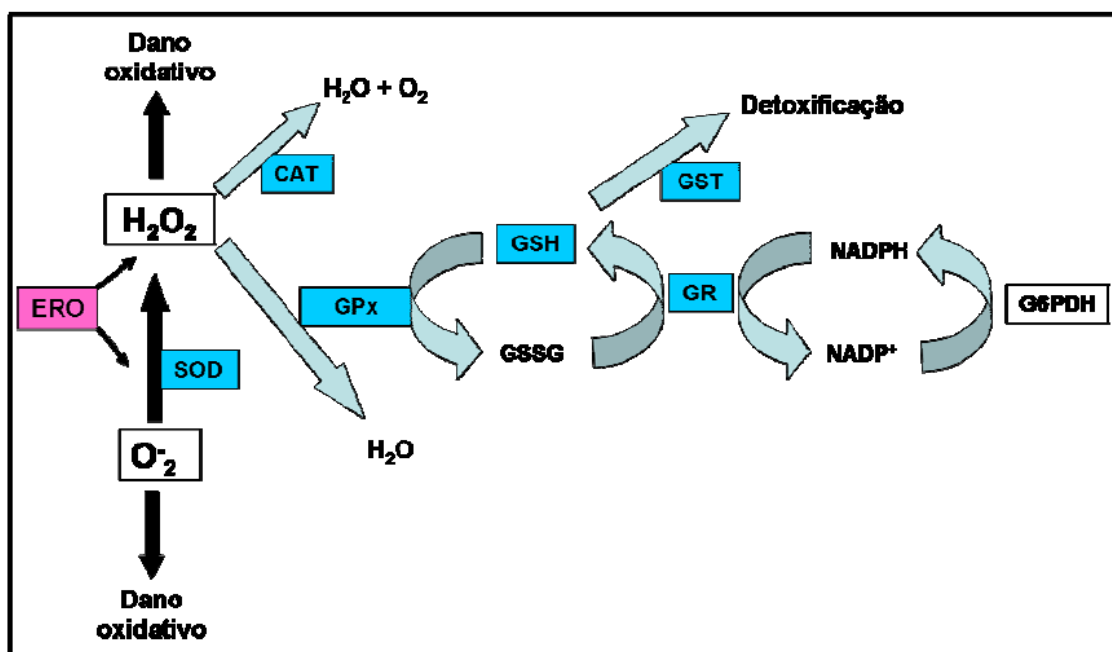


Figura 6. Representação esquemática do mecanismo de defesa antioxidante, enzimático e não enzimático (Extraído de SIMONATO, 2010 e adaptado de HERMES-LIMA, 2004).

O estresse oxidativo ocorre quando a concentração de ERO é mais elevada que a capacidade antioxidante (enzimático e não-enzimático) do organismo para eliminá-las, resultando assim em um aumento na oxidação das biomoléculas. Os danos mais comuns observados em uma situação de estresse oxidativo são a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e danos ao DNA (GIORGIO et al., 2007; AZEVEDO, 2011).

A peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO), ou seja, a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular pode resultar em transtornos na permeabilidade, alteração do fluxo iônico, alteração da seletividade de nutrientes e posteriormente, levar ao rompimento da membrana ou mesmo quebras em moléculas menores, como determinados aldeídos, que por si só são tóxicos para a célula (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005; PAULINO, 2011).

Muitas substâncias tóxicas, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, causam distúrbios osmorregulatórios em teleósteos (GOKSOYR et al., 1996; PACHECO e SANTOS, 2001a; KENNEDY e FARRELL, 2005) e proteínas transportadoras e enzimas envolvidas diretamente na osmorregulação, como a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e a anidrase carbônica, são frequentemente afetadas pela presença destes compostos (KENNEDY e FARRELL, 2005; SOUZA, 2007).

A NKA, formada por três subunidades (α , β e γ), possui grande importância na regulação da osmolalidade do corpo todo (ALAM e FRANKEL, 2006), uma vez que está diretamente ligada ao mecanismo de transporte ativo de Na^+ e K^+ , e a manutenção do gradiente eletroquímico que permite o influxo de Na^+ do meio externo via membrana apical, sendo o transporte de Cl^- também

favorecido pela geração do gradiente eletroquímico (BIANCHINI, 2009). No transporte destes íons, a enzima possui duas diferentes conformações, E1 (fosforilada) e E2 (desfosforilada). Na primeira, ela tem alta afinidade pelo Na^+ intracelular e na E2 tem alta afinidade pelo K^+ extracelular. A ciclagem entre E1 e E2 resulta no transporte de 3 íons sódio para fora da célula e a entrada de 2 íons potássio, utilizando uma molécula de ATP e um íon Mg^{+2} como co-fator na fosforilação da enzima (HORISBERGER, 2004; MASSUI, 2005; PAULINO, 2011) (Figura 7).

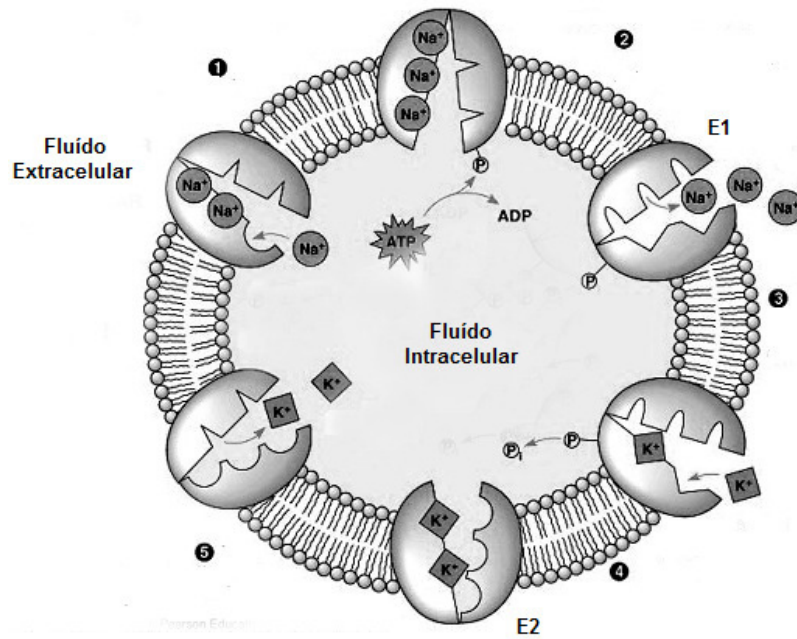


Figura 7. Esquema do funcionamento da Na^+/K^+ -ATPase. **1)** O ATP e 3 Na^+ se ligam no sítio específico da enzima, **2)** a enzima é fosforilada pelo ATP ocorrendo à mudança conformacional (E1) e o sítio para o sódio se torna exposto para a superfície extracelular. As moléculas de sódio, agora com baixa afinidade pela enzima são liberadas, **3)** 2 K^+ extracelular se ligam no sítio de ligação com alta afinidade, **4)** A enzima é desfosforilada e ocorre outra mudança conformacional (E2) e **5)** os íons potássio são levados para o interior celular. (Extraído de PAULINO, 2011 e adaptado de CUMMINGS, B. – Pearson Education, Inc).

A anidrase carbônica, enzima também diretamente ligada à regulação osmo-iônica nos organismos, catalisa a formação de bicarbonato e prótons a partir da hidratação do gás carbônico ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$), utilizando zinco como co-fator. Sendo assim, além dos prótons, utilizados na troca Na^+/H^+ , a anidrase carbônica fornece também HCO_3^- , o qual é secretado em contrapartida à assimilação de Cl^- (BIANCHINI, 2009).

Os xenobióticos podem alterar a atividade destas enzimas através da interrupção da produção de energia em vias metabólicas, indiretamente através da alteração das concentrações iônicas na água, ou interagindo diretamente sobre elas (SANCHO et al., 1997; AGRAHARI e GOPAL, 2008), demonstrando assim que estas enzimas podem efetivamente serem utilizadas como indicadores de competência osmorregulatória (SHIKANO e FUJIO, 1998; PAULINO, 2011).

A figura 8 mostra as trocas iônicas associadas a atividade destas duas enzimas.

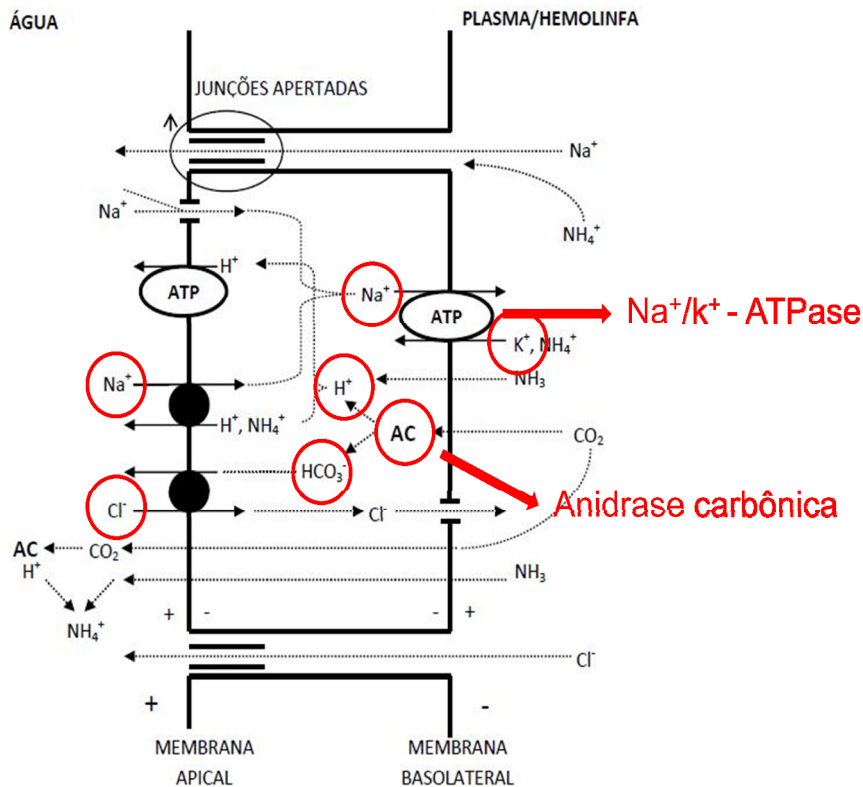


Figura 8. Representação esquemática geral do transporte de íons realizado pelas enzimas Na^+/K^+ - ATPase e anidrase carbônica no epitélio de brânquias e rins de peixes de água doce. Extraído de BIANCHINI et al. (2009) e adaptado de GROSELL et al. (2002).

1.5.2 Biomarcadores osmo-iônicos

O sangue é constituído basicamente de células e plasma, onde estão dissolvidos os gases, hormônios e íons responsáveis pela homeostasia do organismo.

A regulação osmo-iônica permite ao organismo manter ativamente a homeostasia do seu fluido extracelular (plasma) (JOBILING, 1995; RANDALL et al., 1999; SCHMIDT-NIELSEN, 1996). No caso de teleosteos de água doce, o fluido corporal é hiperosmótico em relação ao meio, dessa forma, esses animais precisam evitar o ganho de água e a perda de íons por difusão. Para compensar estas perdas de solutos, o animal capta íons ativamente a partir do meio (SOUZA, 2007).

Como já citado, distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes, devido principalmente à íntima relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente aquático (WENDELAAR BONGA, 1997). Assim, a osmolalidade plasmática, as concentrações individuais dos íons sódio, cloreto e potássio, são

exemplos de variáveis fisiológicas utilizadas como indicadores de efeitos subletais de poluentes em peixes (ABEL, 1989; SIMONATO, 2006).

Distúrbios nas concentrações plasmáticas de íons e/ou distúrbios na osmolalidade do plasma já foram observadas em várias espécies de peixes expostas a altas concentrações de hidrocarbonetos de petróleo (ENGELHARDT et al., 1981, SIMONATO, 2006).

1.5.3 Biomarcadores morfológicos

Alterações a nível morfológico refletem um impacto gradual no metabolismo e levam a respostas adaptativas ou degenerativas, com conseqüências importantes na sobrevivência do animal. Em peixes, os órgãos mais utilizados nesses estudos são brânquias, fígado e rins, mas por serem afetados também por bactérias, vírus e parasitas, uma avaliação da saúde do animal é importante para diferenciar danos induzidos por agentes tóxicos e doenças (CHOVANEC et al., 2003; PAMPLONA, 2009).

Uma vez que as alterações histopatológicas em tecidos de peixes constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo, pode-se dizer que estas alterações podem ser indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (HINTON et al., 1992; SCHWAIGER et al., 1997).

Muitos estressores afetam a estrutura branquial e, direta ou indiretamente, as trocas gasosas e o balanço hidromineral, que constituem as principais razões para a vulnerabilidade destes animais em águas poluídas (WENDELAAR BONGA, 1997). Sendo as brânquias extremamente importantes para a respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção de nitrogênio (HEATH, 1987), a análise de sua morfologia pode ser muito útil como parâmetro para o monitoramento ambiental (SCHWAIGER et al., 1997; SIMONATO, 2006).

De acordo com MALLAT (1985), os tipos de alterações morfológicas mais encontradas nas brânquias frente a agentes químicos e físicos presentes no ambiente, enfocando principalmente as regiões interlamelar e lamelar, são: descolamento do epitélio, necrose, fusão lamelar, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia lamelar por crescimento celular, ruptura de células epiteliais, hipersecreção de muco, aneurisma lamelar, congestão (alteração no espaço sanguíneo delimitado pelas células pilares), proliferação de células mucosas e de células-cloreto e infiltração de leucócitos no epitélio (edema) (Figura 9).

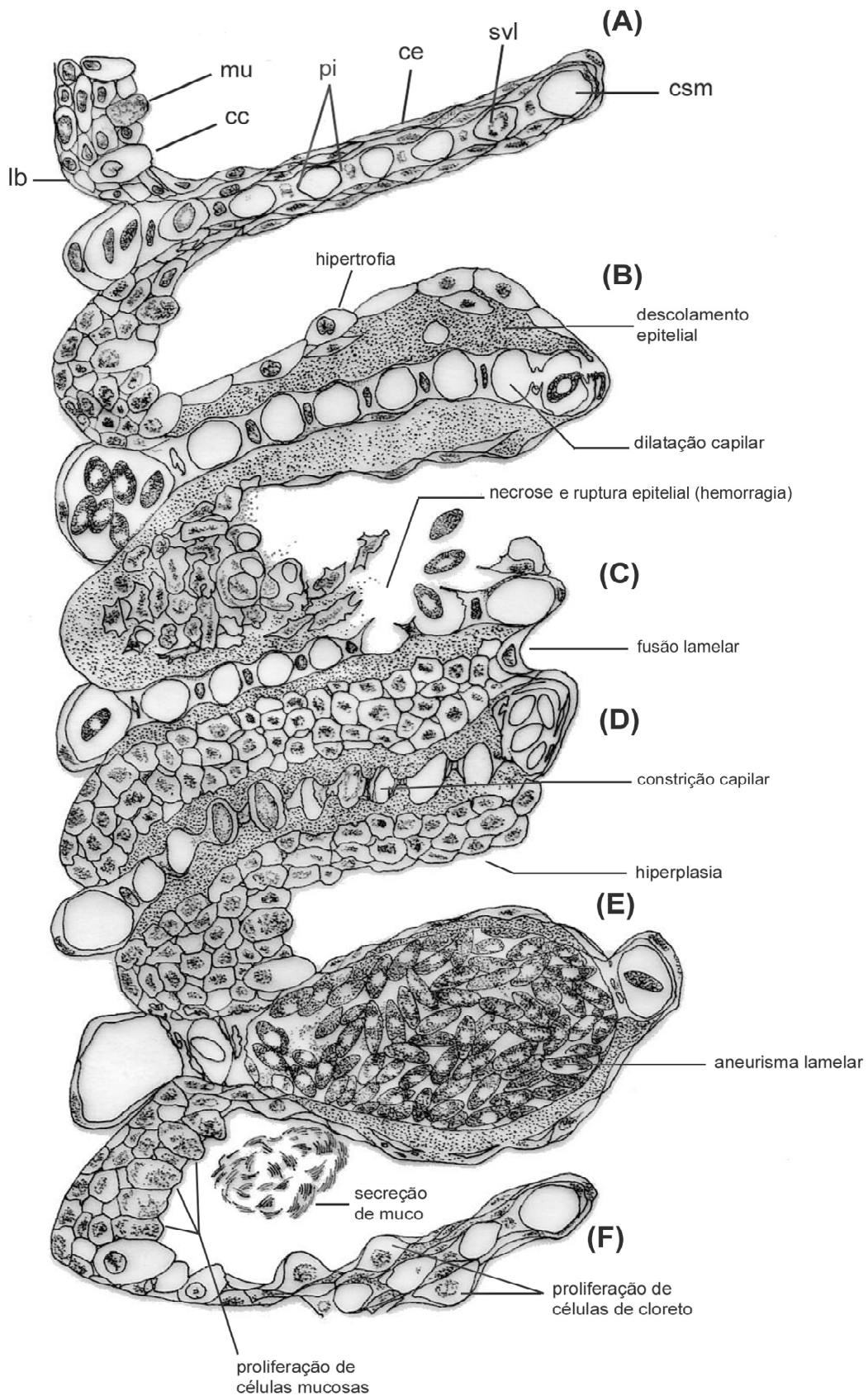


Figura 9. Esquema das lesões branquiais mais comuns de acordo com levantamento realizado por MALLAT (1985). (A) lamela normal, (B-F) lamelas alteradas. Abreviações: lb = lâmina basal; CC = célula-cloreto; mu = célula mucosa; pi = célula pilar; ce = célula epitelial lamelar; svl = seio venoso lamelar; csm = canal sangüíneo marginal (Extraído de MACHADO, 1999, modificado de MALLAT, 1985).

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

A imunomarcção permite a localização dessas células e a intensidade de atividade da Na^+/K^+ -ATPase, de acordo com a quantidade de unidades presentes, e pode ser um excelente biomarcador para os processos osmorregulatórios em brânquias e rins de peixes (SHIKANO e FUJIO, 1998). Além da imunomarcção para a localização das células-cloreto, a determinação da superfície apical das células-cloreto em brânquias também tem sido amplamente utilizada para avaliar as respostas ou alterações dessas células às condições ambientais. (LAURENT, 1984; PISAM e RAMBOURG, 1991; WILSON e LAURENT, 2002; PAULINO, 2011).

Considerando que lesões no tecido renal podem ser indicações de toxinas específicas, uma vez que um grande volume de sangue flui através dele, estas lesões podem ser muito úteis como indicadores para o monitoramento de efeitos de contaminantes (OVERSTREET, 1988; HINTON et al., 1992; SCHWAIGER et al., 1997). Em avaliações toxicológicas e ambientais já foram descritas alterações histológicas nos rins como, degeneração da hialina, oclusão da luz tubular, degeneração granular, degeneração tubular, túbulos em regeneração, vacuolização celular, aumento do volume glomerular, redução do espaço de Bowman, dilatação dos capilares e necrose (SILVA, 2004; PAMPLONA, 2009).

1.5.4 Biomarcadores hematológicos

O sangue é o primeiro tecido a entrar em contato com os xenobióticos e ao ser distribuído entre os demais tecidos, estes também sofrerão distúrbios fisiológicos devido à exposição (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MAZON et al., 2002; RUAS et al., 2008; SADAUSKAS-HENRIQUE et al., 2010).

A exposição a poluentes químicos ambientais pode induzir alterações em vários parâmetros hematológicos, tais como: concentração de hemoglobina, tamanho e/ou número de seus eritrócitos, tamanho e/ou número de leucócitos, demonstrando assim que estes parâmetros podem ser empregados como biomarcadores (SIMONATO, 2006). A avaliação de eritrócitos inclui a contagem total de eritrócitos e a determinação da concentração de hemoglobina, e a avaliação de leucócitos inclui a contagem total e diferencial dos mesmos. A avaliação adequada de vários parâmetros do hemograma depende de intervalos de referência, diferentes para cada espécie e escassos para muitas delas. Ainda assim, a avaliação desses parâmetros hematológicos pode

fornecer importantes inferências sobre o processo de patologia que afeta o peixe estudado (STOSKOPF, 1988; PAMPLONA, 2009).

1.5.5 Biomarcadores genéticos

A investigação de efeitos genotóxicos empregando a frequência de micronúcleos e aberrações nucleares em eritrócitos de sangue periférico de peixes constituem uma importante abordagem para estudos de qualidade do ambiente aquático, permitindo a detecção de quebra ou perda cromossômica ocasionada por xenobióticos lançados no meio aquático.

O teste do micronúcleo é um teste rápido e sensível, tanto para detectar alterações cromossômicas estruturais e numéricas (HEDDLE et al., 1983), consistindo na coloração de um esfregaço de sangue e contagem de eritrócitos para a quantificação de células contendo micronúcleos e outras anormalidades como núcleos lobulados, segmentados e em forma de rim (PRETTI et al., 2007).

1.6 Espécie *Prochilodus lineatus*

O gênero *Prochilodus*, pertencente à família Prochilodontidae, destaca-se pela ampla distribuição na região neotropical e possui 13 espécies descritas até o momento (REIS et al., 2003). Todas as espécies possuem corpo de porte médio a grande, são detritívoros, dependem da correnteza do ambiente para nado e migram rio acima, no período de piracema, para reprodução.

A espécie *Prochilodus lineatus* (Figura 10) é nativa das regiões Sul e Sudeste do Brasil, popularmente conhecida como curimba ou curimbatá, encontra-se distribuída particularmente em toda bacia do rio Paraná-Paraguai e rio Paraíba do Sul e é uma espécie economicamente importante, principalmente como fonte de subsistência de populações ribeirinhas através da pesca comercial (CAZENAVE et al., 2009). Ela possui desova única por temporada, grande número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidados parental (LOWE-MCCONNELL, 1999).



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

O *Prochilodus lineatus* é uma espécie detritívora, podendo deste modo, estar em contato direto com poluentes presentes na água e depositados no sedimento e é considerada como um potencial bioindicador para monitoramentos ambientais devido a sua moderada a alta sensibilidade a contaminantes (SIMONATO, 2006).

Segundo a classificação de Valenciennes (1836), a espécie ocupa a seguinte classificação sistemática:

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Divisão: Teleostei

Superordem: Acanthopterygii

Ordem: Characiformes

Subordem: Characoidei

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando o aumento das concentrações de fenantreno nos ambientes aquáticos e a pouca informação disponível sobre sua toxicidade em peixes de água doce, o objetivo deste trabalho foi determinar a toxicidade aguda do fenantreno para a espécie *Prochilodus lineatus* e investigar os seus efeitos sobre as brânquias e rins desta espécie quando exposta a concentrações subletais do fenantreno, utilizando-se biomarcadores bioquímicos, morfológicos, osmo-iônicos, hematológicos e genéticos.

2.2 Objetivos específicos

1) Estimar a toxicidade aguda, CL50;96h, do fenantreno para juvenis de curimatá (*P. lineatus*);

2) Avaliar a ocorrência de alterações na osmorregulação e equilíbrio iônico de *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de fenantreno (determinadas a partir da CL50;96h) durante 24 ou 96h, através de análise de variáveis plasmáticas e da atividade de enzimas branquiais e renais envolvidas na osmorregulação;

3) Avaliar a ocorrência de alterações nas brânquias de *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de fenantreno (determinadas a partir da CL50;96h) durante 24 ou 96h, através de análise de parâmetros morfológicos e bioquímicos;

4) Avaliar a ocorrência de alterações em rins posteriores de *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de fenantreno (determinadas a partir da CL50;96h) durante 24 ou 96h, através de análise de parâmetros morfológicos e bioquímicos;

5) Avaliar a ocorrência de alterações hematológicas em *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de fenantreno (determinadas a partir da CL50;96h) durante 24 ou 96h, utilizando variáveis hematológicas e genéticas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Espécimes jovens de *P. lineatus* [Massa corpórea (M_C) = $27,8 \pm 3,08$ g e Comprimento total (Ct) = $13,3 \pm 0,65$ cm] foram obtidos da Estação de Aquicultura da Usina Hidroelétrica de Furnas, São José da Barra, MG, Brasil. Os peixes foram aclimatados durante 30 dias em tanques de 1000 L, com aeração e fluxo contínuo de água dechlorada a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo natural (~12:12 horas). Os peixes foram alimentados uma vez ao dia, no período da manhã, com ração comercial (40% de proteína). A alimentação foi suspensa 48 horas antes do início dos experimentos. Os parâmetros da qualidade da água foram monitorados: oxigênio dissolvido ($7.0-7.5$ mg L⁻¹), pH (6,9-7,4), condutividade ($124-130$ $\mu\text{S cm}^{-1}$), alcalinidade ($35-43$ mg L⁻¹ CaCO₃) e dureza total ($39-50$ mg L⁻¹ CaCO₃).

3.2 Desenho experimental

3.2.1 CL50;96h

Após aclimatação, foram realizados ensaios preliminares aos testes para determinação da CL50;96h do fenantreno para *P. lineatus*, com o objetivo de determinar os intervalos de concentração em que ocorria zero e 100% de mortalidade e, posteriormente esse intervalo foi utilizado nos testes definitivos para determinação da CL50;96h (ABNT, 2006). As concentrações de fenantreno foram obtidas de uma solução estoque preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mg.mL⁻¹.

No ensaio de toxicidade para determinação da CL50;96h do fenantreno para o *P. lineatus* foram utilizados exemplares ($n_{\text{total}} = 15$) com massa corpórea em torno de 28 gramas. Os organismos foram expostos a quatro concentrações (500, 1000, 1200 e 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e um controle (ausência de fenantreno na água), em triplicata (RAND e PETROCELLI, 1985) por um período de 96 horas, sem alimentação.

Os testes foram conduzidos em sistema estático, sem substituição e sifonagem de água e as variáveis físicas e químicas da água monitoradas durante toda a realização do teste (oxigênio dissolvido - $7.0-7.5$ mg L⁻¹, pH - 6,9-7,4, condutividade - $124-130$ $\mu\text{S cm}^{-1}$, alcalinidade - $35-43$ mg L⁻¹ CaCO₃ e dureza total - $39-50$ mg L⁻¹ CaCO₃). A avaliação da mortalidade foi diária, com a retirada dos peixes mortos dos aquários.

Os dados de mortalidade foram submetidos à análise de regressão linear para a verificação da relação concentração-mortalidade e os valores da CL50;96h foram calculados pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977).

3.2.2 Testes subletais

A partir da CL50;96h estimada para *P. lineatus* (1,013 mg.L⁻¹ ou 1013 µg.L⁻¹) foram determinadas as concentrações subletais para a realização dos testes ecotoxicológicos definitivos, que foram 10; 20 e 200 µg.L⁻¹ de fenantreno, seguindo os quocientes: CL50/100, CL50/50 e CL50/5, como recomendado por Lombardi (2004).

Os peixes foram divididos randomicamente em oito grupos, sendo quatro grupos experimentais para cada período de exposição (24 e 96h), grupo controle (C) e grupos expostos a 10 µg.L⁻¹(E₁), 20 µg.L⁻¹(E₂) e 200 µg.L⁻¹(E₃) de fenantreno. Cada grupo de peixes (n = 15) foi colocado em aquários de 200 L e mantidos em sistema semi-estático com renovação de 2/3 água a cada 24 h. As concentrações de fenantreno foram obtidas de uma solução estoque preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1 mg.mL⁻¹. Posteriormente, testes foram realizados somente com dimetilsulfóxido (DMSO) na diluição final de 200µL.L⁻¹ (correspondente a quantidade de DMSO utilizada na solução estoque para obter concentração final de 200 µg.L⁻¹ de fenantreno) para averiguação do seu possível efeito nos resultados observados, porém não foram detectados efeitos significativos do DMSO sobre os parâmetros analisados (resultados não apresentados neste trabalho). O oxigênio dissolvido, a temperatura e o fotoperíodo foram mantidos como descritos na aclimatação.

Também foram realizadas medições da concentração de fenantreno na água dos aquários em teste no início dos experimentos, antes da renovação da água e após a renovação da água, averiguando-se assim o decaimento do composto após 24h de exposição. As determinações da concentração de fenantreno na água foram efetuadas utilizando cromatografia de fase gasosa e espectrometro de massas, pela Dra. Patrícia Gomes Costa no Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO), alocado no Instituto de Oceanografia (IO) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG), cujo responsável é o Prof. Dr. Gilberto Fillmann.

Para análise de fenantreno foram utilizados reagentes de alto grau de pureza, de modo a não interferir nas análises. Todos os reagentes utilizados foram grau análise de resíduo da J.T.Baker[®]. A sílica gel 60 (Merck, 60-200 mesh ASTM) e a alumina (Al₂O₃) neutra (Merck, 70-230 mesh ASTM) foram previamente calcinadas em mufla a 450 °C durante 6h. A ativação dos adsorventes foi feita a 160 °C por 4 h, sendo posteriormente desativados com 5 % em peso de água ultrapura

obtida em sistema Milli-Q[®] extraída com *n*-hexano. O sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) (Merck, 10-60 mesh), granular, foi calcinado a 450 °C durante 6h.

As amostras de água (incluindo a fração dissolvida e particulada) foram extraídas pelo método de extração em fase sólida (EFS) (Lanças, 2004) utilizando cartuchos de 6 mL contendo 500 mg de C18 (IST Isolute). Após uma etapa de condicionamento do C18 com metanol (9 mL), e 9 mL de água ultrapura obtida em sistema Milli-Q[®] os frascos de 150 mL contendo as amostras de água foram conectados por um tubo de teflon ao topo dos cartuchos e as amostras lentamente aspiradas através do C18 com aplicação de vácuo. Os cartuchos foram secos e os analitos retidos no C18 foram eluídos com acetato de etila (9 mL) seguido de *n*-hexano (9 mL) (Figura 11), sendo posteriormente concentrados a 1 mL em fluxo suave de N₂ e mantidos a 10 °C até a etapa de fracionamento.

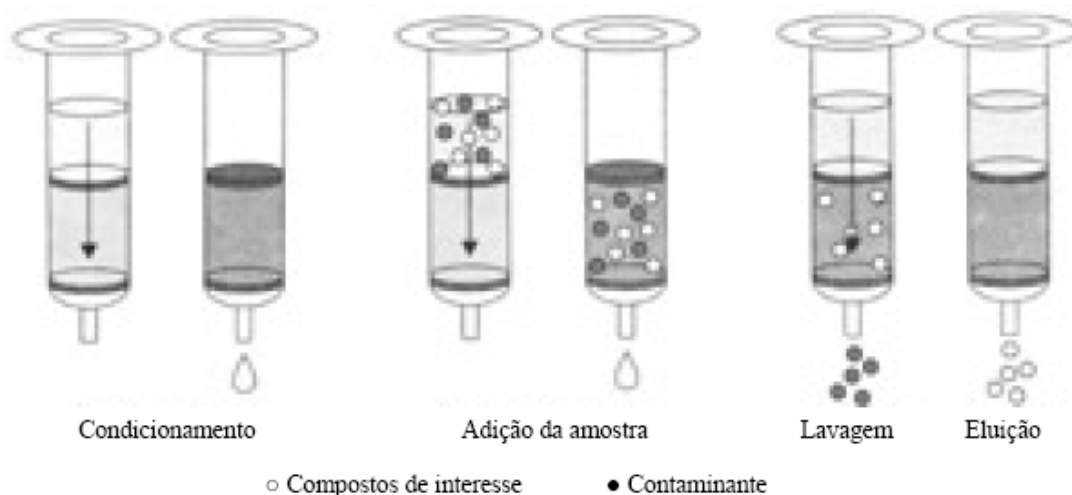


Figura 11. Etapas extração em fase sólida (LANÇAS, 2004)

O fracionamento dos extratos foi obtida por cromatografia de fase líquida de adsorção em coluna aberta composta pelos adsorventes alumina (8g) / sílica (6g). A identificação e quantificação do fenantreno foi realizada em um cromatógrafo de fase gasosa Perkin Elmer[®] Clarus 500 equipado com detector de espectrometria de massas (CG-EM) e injetor automático de amostra. Foi utilizada uma coluna cromatográfica capilar (Elite[®] - 5MS – 5% Diphenil – 95 % Dimetilsiloxane) de 30 metros, 0,25mm DI e 0,25 µm de espessura de filme. A programação de temperatura iniciou em 40 °C com aumento à taxa de 10 °C min⁻¹ até 60 °C, aumento da temperatura na razão 5 °C min⁻¹ até 290 °C, sendo mantida por 5 min e aumento da temperatura na razão 10 °C min⁻¹ até 300 °C, sendo mantida por 10 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 280 °C no modo *splitless* (fluxo do *split* 50:1 após 1 min). A linha de transferência foi mantida a 280 °C e a fonte do detector a 200 °C

com energia de 70 eV. Foi utilizado He como gás carreador em um fluxo de 1,3 mL min⁻¹. Um volume de 1 µL de amostra foi injetado no modo *SIFI* que permite o escaneamento simultâneo nos modos íons seletivo (SIM) e completo (*FullScan*).

A identificação do fenantreno foi baseada nos tempos de retenção de padrões autênticos (Figura 12) e nos espectros de massa de cada analito. A quantificação foi realizada contra padrões externos (Figura 12) através das curvas analíticas de cada analito e método de cálculo por padronização interna utilizando-se o padrão deuterado Fenantreno-D10. A recuperação da metodologia foi avaliada utilizando o p-terfenil-D14 como padrão de recuperação e o desempenho analítico através da análise de materiais de referência certificados e brancos analíticos (Figura 13). O limite de quantificação do método (LQM) foi de 0,125 ng mL⁻¹.

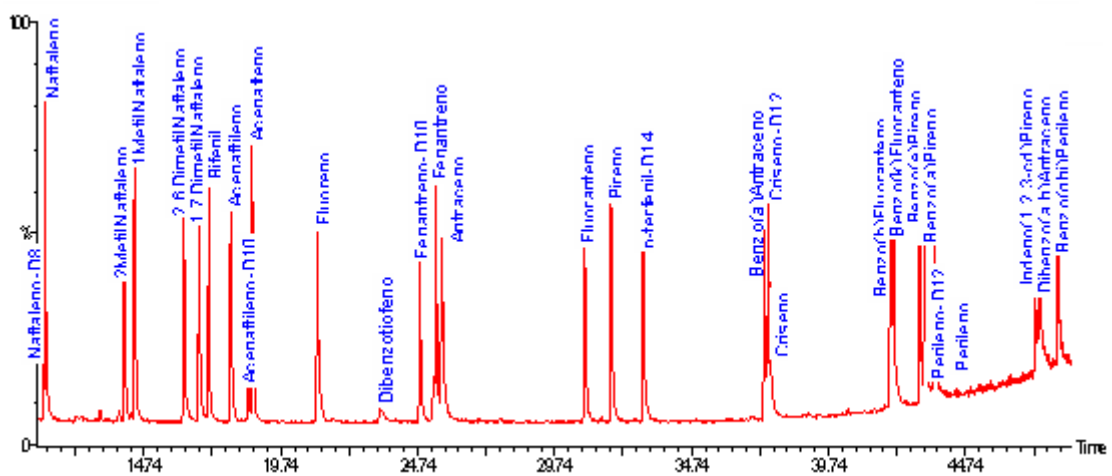


Figura 12. Cromatograma no modo FullScan com os tempos de retenção e íons característicos representativos dos padrões externos de HPAs (500 ng mL⁻¹).

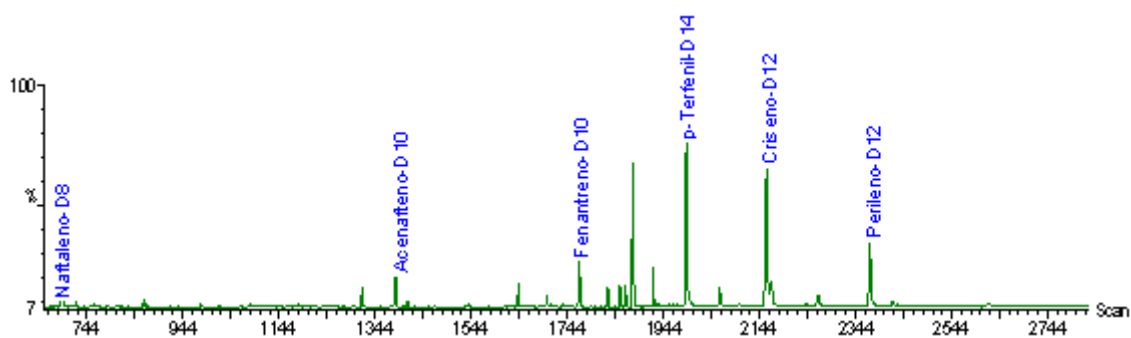


Figura 13. Cromatograma no modo FullScan com os tempos de retenção e íons característicos dos padrões internos, padrão surrogate e interferentes representativos de um branco analítico.

3.3 Amostras de tecido

No final do período de 24 ou 96 horas, amostras de sangue (0,5 a 1,0mL) foram coletadas, via punção caudal, com seringas previamente heparinizadas e, em seguida, os peixes foram sacrificados por secção medular. Parte do sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C, sendo o plasma separado para posterior análise dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e osmolalidade total, e outra parte foi processada para a análise das variáveis hematológicas e genotóxicas, que serão posteriormente citadas. Após a biometria, as brânquias e os rins posteriores foram cuidadosamente removidos, lavados em solução de salina fisiológica (NaCl 0,9%), parte dos órgãos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,3) para análises histopatológicas e em microscopia eletrônica de varredura, e outra parte fixada em solução bouin para a realização da técnica de imunohistoquímica das células-cloreto. Amostras das brânquias e do rim posterior também foram congeladas a -80°C sem tampão para a determinação das atividades da enzima anidrase carbônica e das enzimas de estresse oxidativo, e em tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4), para determinação da atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA).

3.4 Análise das variáveis plasmáticas: íons e osmolalidade total

As concentrações dos íons Na^+ e K^+ foram determinadas utilizando um fotômetro de chama (DIGMED DM-61), na proporção 1:100 de plasma e água destilada. A concentração de íons Cl^- foi determinada utilizando um kit comercial (LABTEST) com absorvância de 490 nm, em uma leitora de microplaca (MRX-HD-DYNEX TECHNOLOGIES, INC.). As concentrações de íons plasmáticos foram expressas em mEq.L^{-1} . A osmolalidade plasmática foi determinada utilizando um semi-microsmômetro ($\mu\text{OSMETTE PRECISION SYSTEM}$) que tem como base o ponto de congelamento e foi expressa em mOsmol.kg^{-1} .

3.5 Análise das variáveis hematológicas

As amostras de sangue foram divididas e processadas de acordo com as análises subsequentes. As variáveis hematológicas analisadas foram: número de eritrócitos (RBC), hematócrito (Hct) e taxa de hemoglobina (Hb); com as quais posteriormente foram calculados os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM)

e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM); contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de trombócitos.

3.5.1 Hematócrito (Hct)

Determinou-se o hematócrito aplicando o método de microhematócrito com tubo capilar heparinizado de 75 nm, em que depois de preenchidos os tubos com amostra de sangue, eles são vedados com massa de modelar e centrifugados a 12000 rpm por cinco minutos em uma centrífuga de microhematócrito (FANEN, mod. 207/N) para que os eritrócitos contidos no sangue total fossem concentrados sem hemólise. Um cartão de leitura de hematócrito foi utilizado para a determinação do seu valor, em porcentagem.

3.5.2 Dosagem de hemoglobina total ([Hb])

A concentração de hemoglobina total ($[Hb] = \text{g} \cdot 100\text{mL}^{-1}$) foi determinada a partir de amostras de 10 μL de sangue total segundo o método de formação de cianometahemoglobina (reagente de Drabkin) através da adição de ferrocianeto de potássio para a conversão de $\text{Hb}^- - \text{CN}^-$. Após agitação, a solução diluída permaneceu em repouso por 15 minutos para que ocorresse a hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de acrílico. A leitura foi efetuada em 540 nm em um espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5.

3.5.3 Contagem de eritrócitos (RBC)

Para contagem de eritrócitos foram colocados 10 μL de sangue da amostra em 2 mL de solução de citrato formol e depois transferido volume adequado para câmara de Neubauer, onde os eritrócitos foram então contados em cinco grupos de quadrados. Para o cálculo, somou-se o valor obtido nessa contagem dos cinco grupos de quadrados e multiplicou-se por 10.000, que resultou em número de eritrócitos por milímetro cúbico.

3.5.4 Volume corpuscular médio (VCM)

O cálculo do volume corpuscular médio foi feito através da equação 5.

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hct (\%)} \times 10}{\text{RBC (M.mL}^{-1})} = \mu\text{m}^3$$

Equação 5. Equação utilizada para o cálculo do volume corpuscular médio (VCM), expresso em μm^3

Onde M = milhões.

3.5.5 Hemoglobina corpuscular média (HCM)

O cálculo da hemoglobina corpuscular média foi feito através da equação 6.

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb (g.dL}^{-1}) \times 10}{\text{RBC (M.mL}^{-1})} = \text{pg.cel}^{-1}$$

Equação 6. Equação utilizada para cálculo da hemoglobina corpuscular média (HCM), expressa em pg.cel^{-1} .

Onde M = milhões.

3.5.6 Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

O cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média foi feito através da equação 7.

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb (g.dL}^{-1})}{\text{Hct (\%)}} = \text{g.dL}^{-1}$$

Equação 7. Equação utilizada para cálculo da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), expressa em g.dL^{-1} .

3.5.7 Contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de trombócitos

Para a contagem total e diferencial de leucócitos e contagem de trombócitos foram utilizados cerca de $10\mu\text{L}$ de sangue para confecção da extensão sanguínea e as lâminas secas à temperatura ambiente.

Depois de secas, as lâminas foram coradas por coloração diferencial policromática (Kit Panótico Rápido LB Laborclin) e então realizada a contagem total de leucócitos e trombócitos de acordo com Mcknight (1966), contando-se 5000 células no total e diferenciando-se os eritrócitos, trombócitos e os diferentes tipos de leucócitos, em microscópio de luz (Olympus BX51) com objetiva de 100x.

Para a contagem diferencial de leucócitos contou-se 200 leucócitos separadamente, utilizando a contagem anterior de número de leucócitos totais e completando 200 leucócitos quando necessário (Mcknight, 1966).

3.6 Análise de genotoxicidade – micronúcleo e aberrações nucleares em eritrócitos

Para a contagem de micronúcleo e aberrações nucleares em eritrócitos também foram confeccionadas extensões sanguíneas imediatamente após a coleta do sangue e depois de secas a temperatura ambiente por 24 horas, foram fixadas em metanol por 10 minutos.

Após a fixação, as lâminas foram lavadas em um banho-maria com ácido clorídrico à 60°C por 11 minutos e então coradas com reativo de Schiff por 2 horas, no escuro. Depois deste processo, as lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Olympus BX51) com objetiva de 100x, contando-se as células com a presença de micronúcleos e os diferentes tipos de aberrações nucleares (Figura 14), em um total de 3000 células por animal. Após a contagem, os cálculos (regra de três) foram realizados para expressão dos resultados em número de micronúcleos e aberrações nucleares por mil células (%).

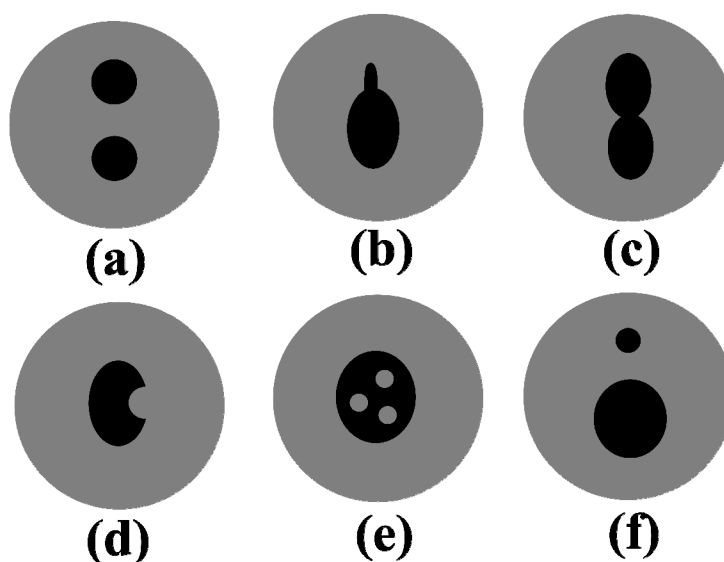


Figura 14. Demonstração dos tipos de aberrações nucleares e dos micronúcleos observados na análise de genotoxicidade. Aberrações nucleares: Binucleado (a), segmentado (b), lobulado (c), forma de rim (d), com vacúolos (e). Micronúcleo (f).

3.7 Análises morfofuncionais

3.7.1 Análise histopatológica em brânquias e rins

Amostras fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,3) foram desidratadas em bateria crescente de etanol até 95% (1 h cada) e embebidas historesina (Leica, Alemanha). Após inclusão, cortes histológicos foram confeccionados longitudinalmente (3 µm de espessura) em micrótomo (Micron HM 360). Os cortes foram corados com Azul de Toluidina, no caso das brânquias e, Azul de Toluidina e Fucsina básica, no caso dos rins, para as análises histopatológicas. A ocorrência de alterações histopatológicas nas brânquias e rins foram avaliadas semi-quantitativamente e determinado o valor médio de alteração (VMA) e o Índice de Alteração Histológica (IAH). O VMA está associado à incidência e distribuição de lesões, de acordo com Schwaiger et al. (1997). Um valor numérico é atribuído, de acordo com a distribuição das alterações para cada animal conforme a escala: *grau 1*: ausência de alteração histopatológica (0-4 tipos de lesões), *grau 2*: ocorrência de lesões pontualmente localizadas (5-9 tipos de lesões) e *grau 3*: lesões amplamente distribuídas pelo órgão (mais de 10 tipos de lesões).

O IAH foi obtido de acordo com Cerqueira e Fernandes (2002) seguindo a metodologia descrita por Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994) em que o índice é calculado de acordo com o número de tipos de alterações histológicas e grau de severidade da lesão. As alterações foram classificadas em três estágios progressivos baseados no grau de possibilidade de restauração das lesões, ou seja, no grau de severidade: estágio I, lesões não muito severas e que não afetam o funcionamento do órgão, reversíveis e pontuais; estágio II, lesões moderadamente severas e que podem afetar o funcionamento do órgão, podem ser irreversíveis, porém, em geral são pontuais; e estágio III, lesões muito severas e normalmente irreversíveis onde o funcionamento do órgão fica muito prejudicado. O IAH é o resultado da somatória dos tipos de lesões encontradas dentro de cada um dos diferentes estágios de severidade, multiplicado pelos seus respectivos pesos (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002), como está demonstrado na equação 7.

$$I = 10^0 \sum_{i=1}^a a_i + 10^1 \sum_{i=1}^b b_i + 10^2 \sum_{i=1}^c c_i$$

Equação 8. Equação utilizada para cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH).

Onde a = alterações de estágio I, b = alterações de estágio II e c = alterações de estágio III. O valor de IAH é dividido em categorias: 0-10 funcionamento normal do órgão, 11-20 danos leves a moderado, 21-50 alterações moderadas a severas no órgão, 51-100 alterações severas no órgão e >100 danos irreparáveis no órgão.

Para as análises descritas acima foram avaliados 10 campos aleatórios para cada amostra sob microscópio de luz (Olympus BX51) com objetivas de 20 e 40x. As imagens foram fotodocumentadas com câmara de vídeo acoplada para registro digital utilizando-se o software Motic Images Plus 2.0. Os tipos de alterações analisadas nas brânquias e nos rins e seus respectivos graus de severidade estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tipos de histopatologias analisadas nas brânquias e rins de *Prochilodus lineatus* e seus respectivos estágios de severidade.

Órgão analisado	ESTÁGIOS		
	I	II	III
Brânquias	Hipertrofia do epitélio lamelar Hiperplasia do epitélio lamelar Congestão vascular Dilatação capilar Descolamento epitelial Constrição capilar Proliferação de células cloreto Proliferação de células mucosas Fusão das lamelas Edema	Aneurisma Lamelar Ruptura Epitelial (hemorragia)	Necrose focal Necrose total
Rim posterior	Hipertrofia celular Hipertrofia nuclear Vacuolização celular Dilatação da luz tubular Túbulos em regeneração Dilatação dos capilares Espessamento do endotélio capilar Aumento do volume glomerular	Rompimento celular Degeneração granular Oclusão da luz tubular Degeneração tubular Novos néfrons Redução do espaço de Bowman Aumento do espaço de Bowman Presença de hemácias no espaço de Bowman Hemorragia Gordura	Necrose

3.7.2 Imunohistoquímica de brânquias e rins

Para a determinação do número de células-cloreto nas brânquias e rins dos animais estudados, foi utilizada a técnica de imunohistoquímica específica para a enzima Na⁺/K⁺-ATPase.

As amostras fixadas em Bouin foram desidratadas em bateria crescente de etanol (50-100%), diafanizadas em xilol (100%) e incluídas em parafina histológica. Cortes longitudinais (8 µm de espessura) foram realizados em micrótomo (Micron HM 360) e lâminas confeccionadas com estes cortes. As lâminas foram desparafinizadas em xilol 100% (2x) por 5 minutos e hidratadas em bateria decrescente de etanol (100-50%) por 3 minutos.

Após este processo, as lâminas foram lavadas (2x) por 10 minutos em tampão salino Tris base + triton 0,5 mM pH 7,4 (TBS-T) diluído 1:10, com agitação contínua. Depois, para o bloqueio de ligações não-específicas, as lâminas foram pré- incubadas durante 20 minutos em soro normal de cabra 20% - NGS (Normal Goat Serum – Gibco Invitrogen), diluído em TBS-T. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o primeiro anti-corpo (alfa 5) - anti Na⁺/K⁺-ATPase diluído em 0,1% TBS-T “overnight” em câmara de incubação úmida a 20°C.

Logo após, as lâminas foram lavadas (2x), durante 10 minutos em TBS-T diluído, e incubadas com o segundo anticorpo, GAMPO (Goat antimouse Peroxidase - Chemicon international, USA), diluído (1:100) por 1 hora em câmara úmida. Após a incubação, foi realizada lavagem com tampão salino Tris base (TB) diluído (1:10). O complexo foi visualizado utilizando a coloração com 3,3'-diaminobenzidina + Sulfato níquel amoniacal (DAB-Ni) e H₂O₂. A coloração foi interrompida em água destilada (2x) por 10 minutos.

As lâminas foram finalizadas usando Entellan e analisadas com o software Motic Image Plus 2.0 em microscópio de luz Olympus BX51, com a contagem de células cloreto no filamento e lamelas (por mm² de epitélio) em 25 campos aleatórios nas brânquias de cada animal e com a contagem de células-cloreto em 40 túbulos renais de cada indivíduo.

3.7.3 Determinação de densidade e área fracional de células-cloreto (CC) em brânquias

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

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

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

$$AFCC = \frac{\sum \text{área de todas as CC}}{\text{área da fotografia}}$$

Equação 9. Equação utilizada para cálculo da Área Fracional de Células-Cloreto (AFCC), expressa em %.

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

Equação 10. Equação utilizada para cálculo da Densidade de Células- Cloreto (AFCC), expressa em número de células por mm².

3.8 Análises bioquímicas

3.8.1 Preparação dos homogeneizados

Para determinação da atividade das enzimas de estresse oxidativo, as amostras de tecidos (brânquias e rins) foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 1:10 M/V (massa/volume) no caso das brânquias e 1:100 M/V (massa/volume), no caso do rim, por maceração em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Para a determinação da atividade da enzima NKA, as amostras de tecidos foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 1:2 M/V por maceração em tampão SEI + b-mercaptoetanol e centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C.

Já para determinação da atividade da enzima anidrase carbônica, as amostras de tecidos foram descongeladas, pesadas e homogeneizadas a 1:10M/V com tampão manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos à temperatura de 4°C para a precipitação dos restos celulares.

3.8.2 Proteína nos homogeneizados de tecido

A determinação da concentração de proteína total nos homogeneizados de tecidos utilizados nas determinações enzimáticas foi realizada segundo o método de Bradford (1976) e adaptado por Kruger (1994), com leitura em 595 nm em uma leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.).

3.8.3 Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) em brânquias e rins

A atividade específica da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial e renal foi determinada pelo método descrito por Zaugg (1982) e adaptado para leitora microplaca por Quabius et al. (1997). A técnica consiste em quantificar a concentração de fosfato inorgânico (Pi) liberado pelo funcionamento da bomba. Em cada poço da microplaca foram pipetados 7 μL do sobrenadante da amostra de brânquias ou rim, e adicionados 100 μL de tampão imidazol contendo 3mM de Na_2ATP (vanadium free, pH 7,45). Posteriormente, aos poços de cada amostra foram adicionados 100 μL de tampão contendo KCl (1mg.mL⁻¹) ou tampão contendo oubaína (1mg.mL⁻¹). A microplaca foi incubada por 60 minutos a 25°C no escuro e a reação foi interrompida pela adição de 200 μL de uma mistura contendo ácido tricloroacético 8,6% (TCA) e o reagente de cor (0,66 mM H_2SO_4 +

9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). A leitura foi feita em 595 nm em leitora de microplacas (MRX-HD - DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) e a atividade da enzima expressa em $\mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

3.8.4 Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) em brânquias e rins

A atividade da AC branquial e renal foi determinada pelo método estabelecido por VITALE et al. (1999), que tem como fundamento a catálise de uma solução de CO_2 pela anidrase carbônica com correspondente liberação de H^+ e então decaimento do pH do meio. O método consistiu na utilização de 7,5mL do mesmo tampão utilizado na homogeneização do tecido (solução de reação), acrescido de 50 μL do sobrenadante do homogeneizado tecidual e 1 mL de água destilada saturada com CO_2 a aproximadamente $2,5^\circ\text{C}$. A redução do pH foi então monitorada por 20 segundos, com intervalos de 4s, através do pHmetro (inoLAB pH, Level 1 da WTW®). Uma reta de regressão linear do pH em relação ao tempo foi encontrada, para que através da inclinação da reta fosse determinada a taxa da reação catalizada (TC) pela enzima presente no homogeneizado tecidual. A taxa de reação não catalizada (TNC) foi medida através da adição de somente 1 mL de água destilada saturada com CO_2 à solução de reação. O cálculo da atividade da AC foi realizado através da fórmula: $\text{AC} = [\text{TC}/(\text{TNC} - 1)]/\text{mg de proteína total}$. A atividade da AC foi expressa em U por mg de proteína (U mg Pt^{-1}).

3.8.5 Atividade das enzimas de estresse oxidativo em brânquias e rins

3.8.5.1 Superóxido dismutase total – SOD

A atividade da SOD foi determinada pela medida da inibição da taxa de redução do citocromo C pelo radical superóxido, segundo a metodologia de MCCORD E FRIDOVICH (1969). Como referência, 1 mL de uma mistura reativa (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,8; EDTA 0,1 mM; xantina 1mM; NaOH 0,001 M) mais 10 μL de xantina oxidase foi utilizada para absorvância padrão de $0,025 \text{ abs.min}^{-1}$. Para as amostras, tanto de brânquias quanto de rim, adicionou-se 10 μL da amostra e as leituras foram feitas em $\lambda = 550 \text{ nm}$. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo C, uma vez que a SOD dismuta o radical superóxido em H_2O e H_2O_2 . A atividade da enzima foi expressa em $\text{U SOD min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$.

3.8.5.2 Catalase – CAT

A atividade da CAT foi mensurada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio em $\lambda = 240 \text{ nm}$, segundo a metodologia de BEUTLER (1975). A redução foi medida durante um minuto em cubeta contendo 1 mL de solução recém preparada de H_2O_2 em água destilada (30%), tampão da catalase (tris 1M; EDTA 5mM) e 20 μl da amostra, no caso do rim e 40 μl de amostra de brânquias. A reação foi iniciada na adição do peróxido de hidrogênio. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ metabolizado min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$.

3.8.5.3 Glutathione peroxidase – GPx

A atividade da GPx selênio-dependente foi determinada pelo método de HOPKINS E TUDHOPE (1973), baseado na oxidação do $\text{NADPH} + \text{H}^+$ em presença do peróxido de hidrogênio em $\lambda = 340 \text{ nm}$. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 1 mL de meio de reação (NADPH , azida sódica 5 mM, GSH, tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0) juntamente com 20 μl de glutathione redutase (GR), 20 μl de H_2O_2 20 mM e 10 μl de amostra, tanto de brânquias quanto de rim. A GPx presente na amostra degrada o H_2O_2 na presença de GSH. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado min}^{-1} \text{mg Pt}^{-1}$.

3.8.5.4 Glutathione reduzida – GSH

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

As amostras foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) 12% (1:1) e após centrifugação (5000 rpm, 4°C, 10 minutos) para precipitar as proteínas, o sobrenadante foi utilizado para analisar o conteúdo de GSH. Aos sobrenadantes foi adicionado um tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 8,0), contendo 0,25 mM de DTNB (1:1).

A formação do ânion tiolato resultante da reação da GSH com o reativo de Elmann, foi determinada em espectrofotômetro a $\lambda = 412 \text{ nm}$. O conteúdo de GSH foi expresso em $\mu\text{g GSH mg Pt}^{-1}$, a partir de uma curva padrão de GSH.

3.8.5.5 Glutathione s-transferase (GST)

A atividade da GST foi medida de acordo com KEEN et al (1976), utilizando 1-cloro-2-4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A mistura reativa continha 100 mM de CDNB em etanol 100%, 100 mM de GSH, tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e extratos enzimáticos. Utilizou-se 980 μL da mistura e 20 μL de amostra, no caso das brânquias e 960 μL da mistura e 40 μL de amostra, nos rins. A formação do aduto glutathione-2-4-dinitrobenzeno foi monitorada pelo aumento da absorvância a 340 nm contra um branco (sem amostra). O coeficiente de extinção molar de $9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para o cálculo da atividade da enzima.

A atividade da GST foi expressa como a quantidade da enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto $\text{min}^{-1} \text{ mg Pt}^{-1}$.

3.8.6 Peroxidação lipídica

Os níveis de lipoperoxidação tecidual foram quantificados utilizando o método FOX (“Ferrous Oxidation-Xylenol Orange”), descrito por Jiang et al. (1992). Esse método consiste na oxidação do Fe^{2+} (sulfato ferroso amoniacal) a Fe^{+3} pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de xilenol laranja. Aliquotas das amostras foram tratadas com TCA 10% e foram incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com 900 μL de mistura reativa contendo 100 μM de alaranjado de xilenol, 250 μM de FeSO_4 , 25 mM de H_2SO_4 e 4 mM de butyl hidroxytolueno diluídos em metanol 90% (v/v). As leituras de absorvância foram feitas em 560 nm. Os níveis de LPO foram expressos em μmol hidroperóxido de lipídio mg proteína^{-1} .

3.9 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média \pm erro-padrão da média. Após aplicação do teste de normalidade (D’Agostino e Pearson), as diferenças entre as variáveis medidas entre os animais expostos em relação ao controle foram detectadas por análise de variância one-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey, utilizando software GraphPad Prisma 5.0. Diferenças estatisticamente significante foram consideradas quando $P < 0,05$ em relação ao grupo controle.

4. RESULTADOS

4.1 Teste de toxicidade aguda - CL50;96h

Durante o período experimental não ocorreu mortalidade no grupo controle e no grupo exposto a 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Os animais expostos a 1000 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno tiveram 33,3% de mortalidade, a 1200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 66,6% de mortalidade e a 1500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ houve 100% de mortalidade. A figura 15 mostra a porcentagem total de mortalidade de peixes em cada concentração de fenantreno e a mortalidade cumulativa a cada 24 horas. A relação concentração-mortalidade utilizada na determinação da concentração letal 50% (CL50;96h) do fenantreno em *P. lineatus* foi estimada em 1,013 mg.L^{-1} , ou 1013 $\mu\text{g.L}^{-1}$, com limite inferior de 0,80 mg.L^{-1} e superior de 1,3 mg.L^{-1} (Figura 16).

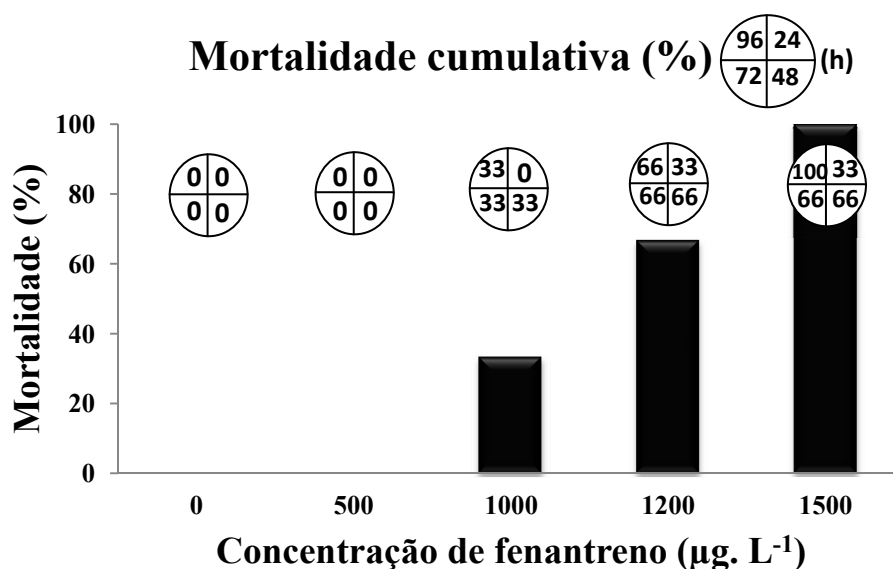


Figura 15. Porcentagem de Mortalidade de *Prochilodus lineatus* (n=3 em cada concentração) exposto ao fenantreno. Os gráficos de pizza indicam, no sentido horário, a porcentagem de mortalidade cumulativa durante a exposição ao fenantreno a cada 24 horas.

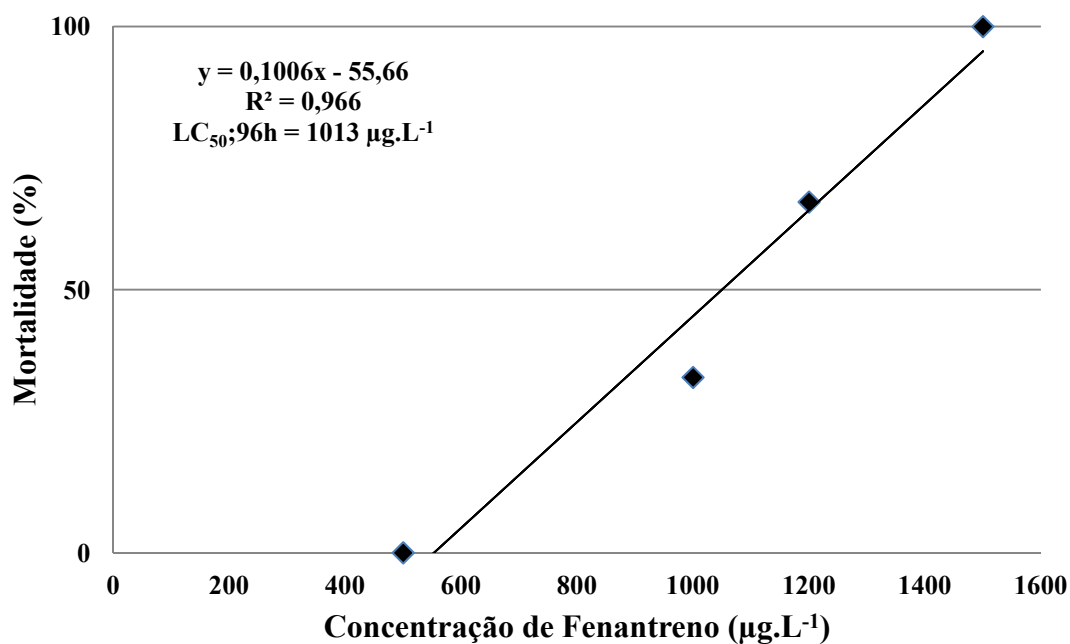


Figura 16. Relação entre concentração de fenantreno e mortalidade, para determinação da CL50;96 horas do composto para *Prochilodus lineatus*.

4.2 Exposição subletal

Os animais expostos as concentrações subletais 10, 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno, que correspondem a 1/100, 1/50 e 1/5 da CL50;96h, não apresentaram mortalidade durante 24 e 96 h. Na tabela 2 pode-se observar as concentrações reais medidas na água dos aquários em teste no início dos experimentos, antes da renovação da água e após a renovação da água, observando-se assim um decaimento médio de 21,84% do fenantreno após 24h de exposição.

Tabela 2. Concentrações reais de fenantreno na água dos aquários em teste em $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Amostra	Início	24 horas (antes troca)	24 horas (após troca)
Controle	0,13	0,00	0,13
10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	12,67	9,38	8,85
20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	21,43	17,26	20,59
200 $\mu\text{g.L}^{-1}$	212,11	169,47	208,72

4.2.1 Osmolalidade e íons plasmáticos

Não houve diferenças significativas na osmolalidade plasmática dos animais dos grupos expostos ao fenantreno por 24 horas. Após 96 h de exposição os animais dos grupos expostos a 10 e 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ fenantreno também não apresentaram diferenças significativas na osmolalidade, porém, no grupo exposto a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a osmolalidade aumentou em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Com relação à concentração plasmática do íon K^+ , ocorreram alterações significativas apenas nos animais expostos a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas, comparado ao controle no mesmo período, sendo que entre os animais do grupo controle e expostos às concentrações de fenantreno por 96 horas, não foram encontradas alterações significativas na concentração deste íon ($p > 0,05$) (Tabela 3).

A concentração plasmática dos íons Na^+ diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos grupos expostos a 10 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas e aumentou significativamente no grupo exposto a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 horas, comparado ao controle no mesmo período. Não ocorreram diferenças significativas na concentração do íon Cl^- em nenhum dos grupos expostos ao fenantreno independente do período de exposição. Apesar das alterações pontuais de Na^+ , a razão Na^+/Cl^- não diferiu significativamente entre o grupo controle e os grupos expostos ao fenantreno, em nenhum dos períodos analisados (Tabela 3).

Tabela 3. Osmolalidade e concentração plasmática dos íons Na^+ , Cl^- e K^+ em *Prochilodus lineatus* expostos a 10, 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno durante 24 e 96 h.

Exposição	Fenantreno	Osmolalidade total (mOsmol.Kg ⁻¹)	Íons (mEq.L ⁻¹)			Razão Na ⁺ /Cl ⁻
			Na ⁺	Cl ⁻	K ⁺	
24 horas	Controle	263,9 ± 5,2	163,2 ± 8,2	88,58 ± 6,36	6,1 ± 0,4	3,61±0,1
	10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	250,3 ± 4,3	135,6 ± 6,4*	97,21 ± 3,74	5,0 ± 0,3	3,06±0,1
	20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	253,5 ± 3,9	150,1 ± 2,1	104,2 ± 6,34	6,7 ± 0,5	3,08±0,1
	200 $\mu\text{g.L}^{-1}$	252,8 ± 5,2	126,8 ± 7,7*	99,56 ± 8,62	4,5 ± 0,3*	3,2±0,1
	Controle	229,7 ± 6,1	128,4 ± 2,8	107,9 ± 5,0	6,2 ± 0,2	1,3±0,1

96 horas	10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	236 \pm 3,4	136,2 \pm 4,1	110,7 \pm 10,5	6,2 \pm 0,3	1,4 \pm 0,1
	20 $\mu\text{g.L}^{-1}$	227 \pm 5,9	134,1 \pm 3,6	88,8 \pm 6,2	6,1 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1
	200 $\mu\text{g.L}^{-1}$	259,4 \pm 4,7*	145,1 \pm 3,3*	108,1 \pm 7,8	6,2 \pm 0,1	1,4 \pm 0,1

Valores expressos em média \pm erro-padrão da média. (*) = diferença significativa ($P < 0,05$).

4.2.2 Variáveis hematológicas

As figuras 17 e 18 mostram os valores médios de Hct, Hb, RBC e dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM) de *P.lineatus* dos grupos controles e expostos ao fenantreno por 24 e 96 horas, respectivamente. Após 24 horas de exposição, o Hct e VCM diminuíram significativamente e o CHCM aumentou após exposição a 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno. Neste mesmo período de exposição, as variáveis Hb, RBC e HCM, não apresentaram diferenças significativas entre os peixes expostos ao fenantreno e o controle.

Nos peixes expostos ao fenantreno por 96 horas, os valores de Hct, RBC e CHCM não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle. Neste mesmo período, a concentração de Hb aumentou nos peixes expostos a menor concentração, 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e os valores de VCM e HCM, aumentaram nos animais expostos a maior concentração, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

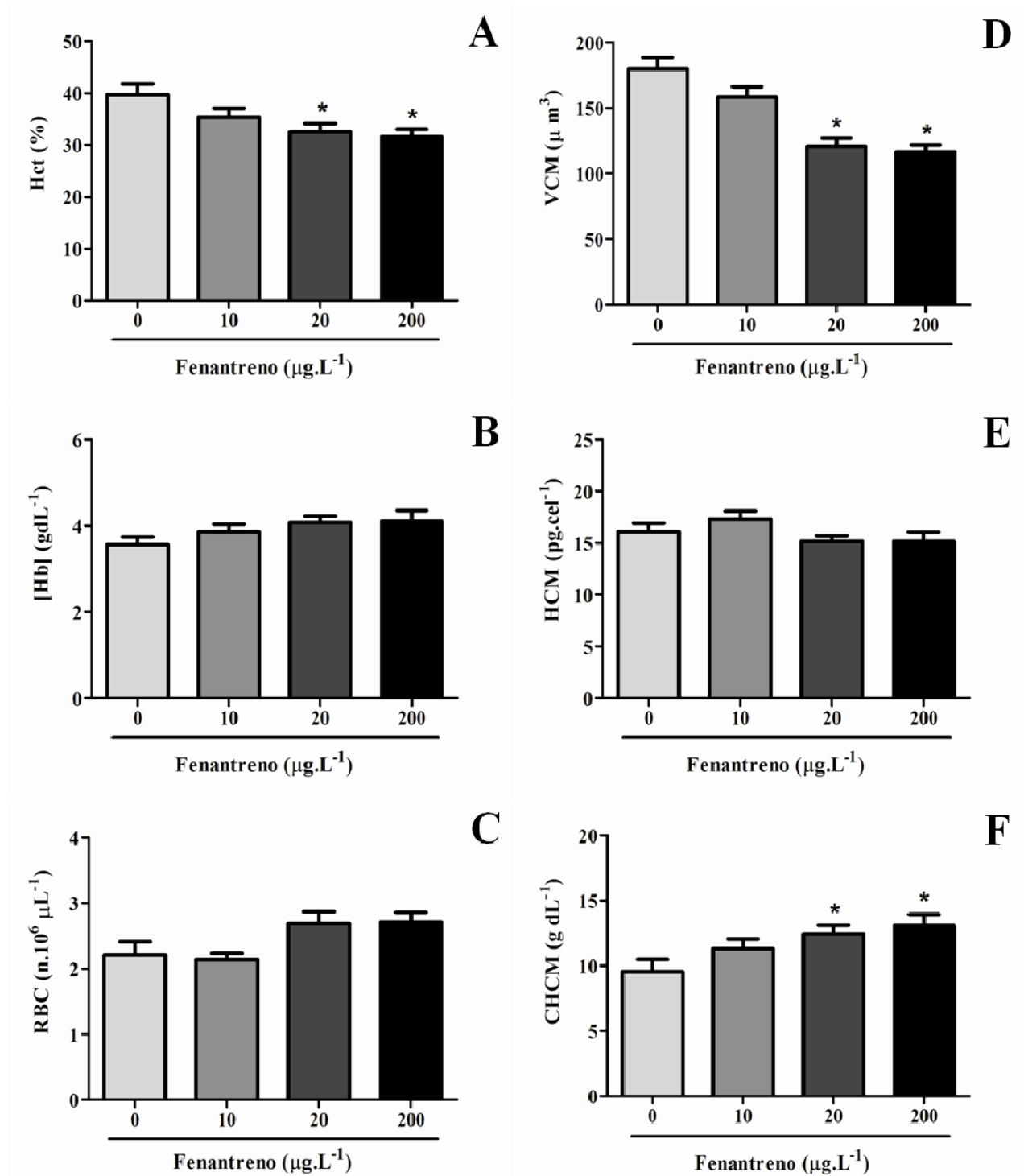


Figura 17. Variáveis hematológicas de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 24 horas: **(A)** Hematócrito (Hct); **(B)** Concentração de hemoglobina ([Hb]); **(C)** Número de eritrócitos (RBC); e índices hematimétricos: **(D)** Volume Corpuscular Médio (VCM), **(E)** Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e **(F)** Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). *indicam diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

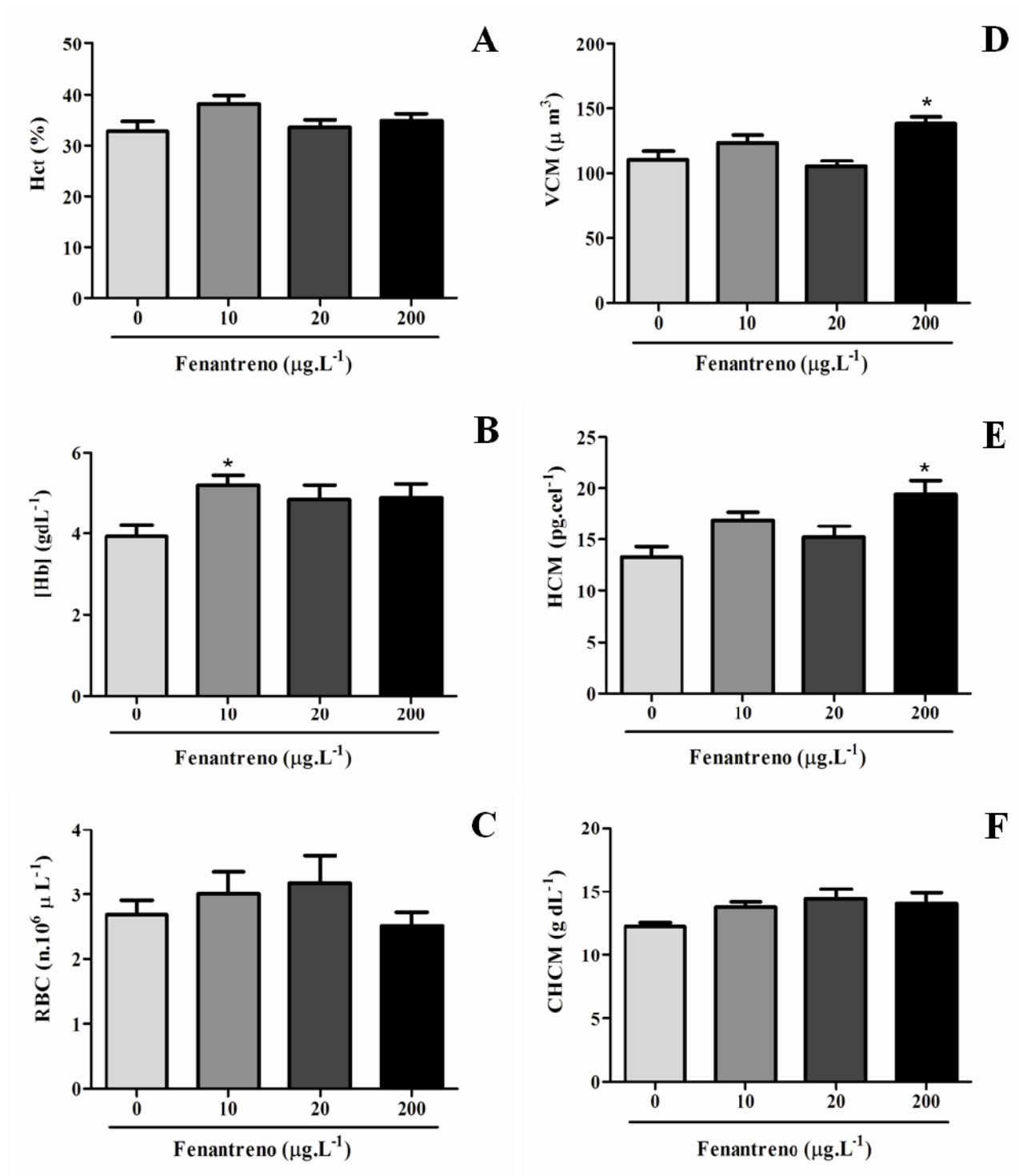


Figura 18. Variáveis hematológicas de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 96 horas: (A) Hematócrito (Hct); (B) Concentração de hemoglobina ([Hb]); (C) Número de eritrócitos (RBC); e índices hematimétricos: (D) Volume Corpuscular Médio (VCM), (E) Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e (F) Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Com relação ao número de leucócitos e trombócitos encontrados no sangue de *Prochilodus lineatus*, ocorreram diferenças significativas somente nos valores de leucócitos dos animais expostos a 10 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno, os quais diminuíram com relação ao grupo controle (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios de leucócitos e trombócitos (número de células x 10³ \pm erro-padrão da media) de *Prochilodus lineatus* do grupo controle e expostos ao fenantreno durante 24 e 96 horas.

Células sanguíneas	Tempo de Exposição	Controle	Concentração de Fenantreno ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
			10	20	200
Leucócitos	24h	74,2 \pm 7,4	53,8 \pm 3	75,5 \pm 4,19	83,2 \pm 8,6
	96h	107,4 \pm 11,21	61,6 \pm 4,74 *	84 \pm 8,77	70,2 \pm 8,25*
Trombócitos	24h	20,8 \pm 3,3	29,5 \pm 5,9	34,8 \pm 6,2	41,5 \pm 5
	96h	23,7 \pm 4,42	42,2 \pm 8,47	37,3 \pm 7,21	43,3 \pm 4,97

*indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

Na contagem diferencial de leucócitos, não houve diferenças significativas entre o grupo controle e exposto ao fenantreno por 24 horas. Já em animais expostos durante 96 horas, houve uma diminuição nos valores de neutrófilos nos peixes expostos a todas as concentrações, enquanto os valores de linfócitos e monócitos aumentaram e diminuíram, respectivamente, apenas em animais expostos as concentrações de 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (Tabela 5).

A figura 19 mostra características morfológicas de eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, monócitos e trombócitos no sangue de *P. lineatus*.

Tabela 5. Porcentagem média na contagem diferencial de leucócitos (\pm erro padrão da média) do sangue de *Prochilodus lineatus* do grupo controle e expostos ao fenantreno durante 24 e 96 horas.

Leucócitos (%)	Tempo de exposição	Controle	Concentração de fenantreno ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
			10	20	200
Linfócitos	24h	80,76 \pm 2,87	82,94 \pm 4,67	82,53 \pm 3,66	83,68 \pm 3,95
	96h	72,41 \pm 5,09	81,8 \pm 4,32	86,32 \pm 1,26*	85,64 \pm 2,08*
Eosinófilos	24h	0	0	0	0
	96h	0	0	0	0
Neutrófilos	24h	10,91 \pm 1,44	10,69 \pm 3,9	12 \pm 3,6	11,75 \pm 3,76
	96h	18,81 \pm 2,78	12,07 \pm 0,7*	12,29 \pm 1,25*	11,32 \pm 1,78*
Monócitos	24h	8,58 \pm 1,89	6,51 \pm 1,59	4,1 \pm 0,54	4,27 \pm 1,05
	96h	9,4 \pm 2,72	6,05 \pm 1,55	1,5 \pm 0,31*	1,9 \pm 0,43*
Basófilos	24h	0	0	0	0
	96h	0	0	0	0

*indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$)

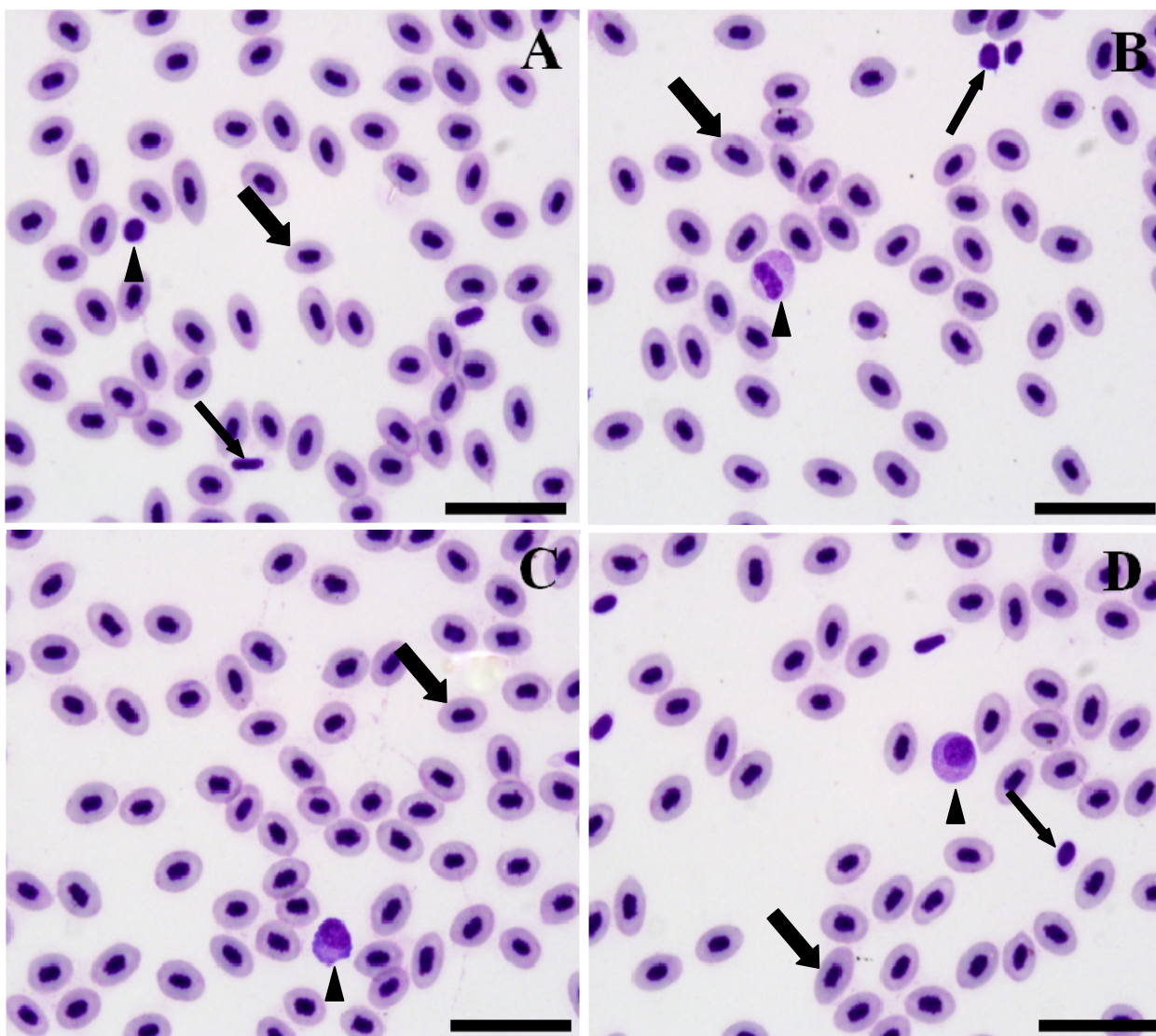


Figura 19. Células sanguíneas de *Prochilodus lineatus*. (A) Eritrócito (setas grossa), trombócito (seta fina) e linfócito (ponta de seta). (B) Linfócito (seta fina), eritrócito (seta grossa) e neutrófilo (ponta de seta). (C) Eritrócitos (seta grossa) e monócito (ponta de seta). (D) Neutrófilo (ponta de seta), eritrócito (seta grossa) e linfócito (seta fina). Barra de escala = 10 μ m.

4.2.3 Variáveis genotóxicas – micronúcleo e aberrações nucleares em eritrócitos.

Na contagem de micronúcleos e aberrações nucleares em eritrócitos de *P. lineatus* foram observadas diferenças significativas entre os grupos controle e expostos, apenas nos micronúcleos eritrocitários dos animais expostos a maior concentração de fenantreno (200 μ g.L⁻¹) durante 96 horas (Tabela 6), os quais apresentaram um aumento em sua quantidade (Figura 20).

Tabela 6. Aberrações nucleares e micronúcleos eritrocitários por mil células ($\% \pm$ erro padrão da média) no sangue de *Prochilodus lineatus* do grupo controle expostos ao fenantreno durante 24 e 96 horas.

	Tempo de exposição	Controle	Concentração de fenantreno ($\mu\text{g L}^{-1}$)		
			10	20	200
Aberrações Nucleares ($\%$)	24h	$3,4 \pm 0,4$	$3,83 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,6$	$4,16 \pm 0,3$
	96h	$6,1 \pm 1,4$	$8,86 \pm 1,2$	$8,63 \pm 1,5$	$7,1 \pm 0,5$
Micronúcleo ($\%$)	24h	$0,13 \pm 0,06$	$0,43 \pm 0,1$	$0,53 \pm 0,25$	$0,46 \pm 0,11$
	96h	0	$0,03 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,1^*$

*indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

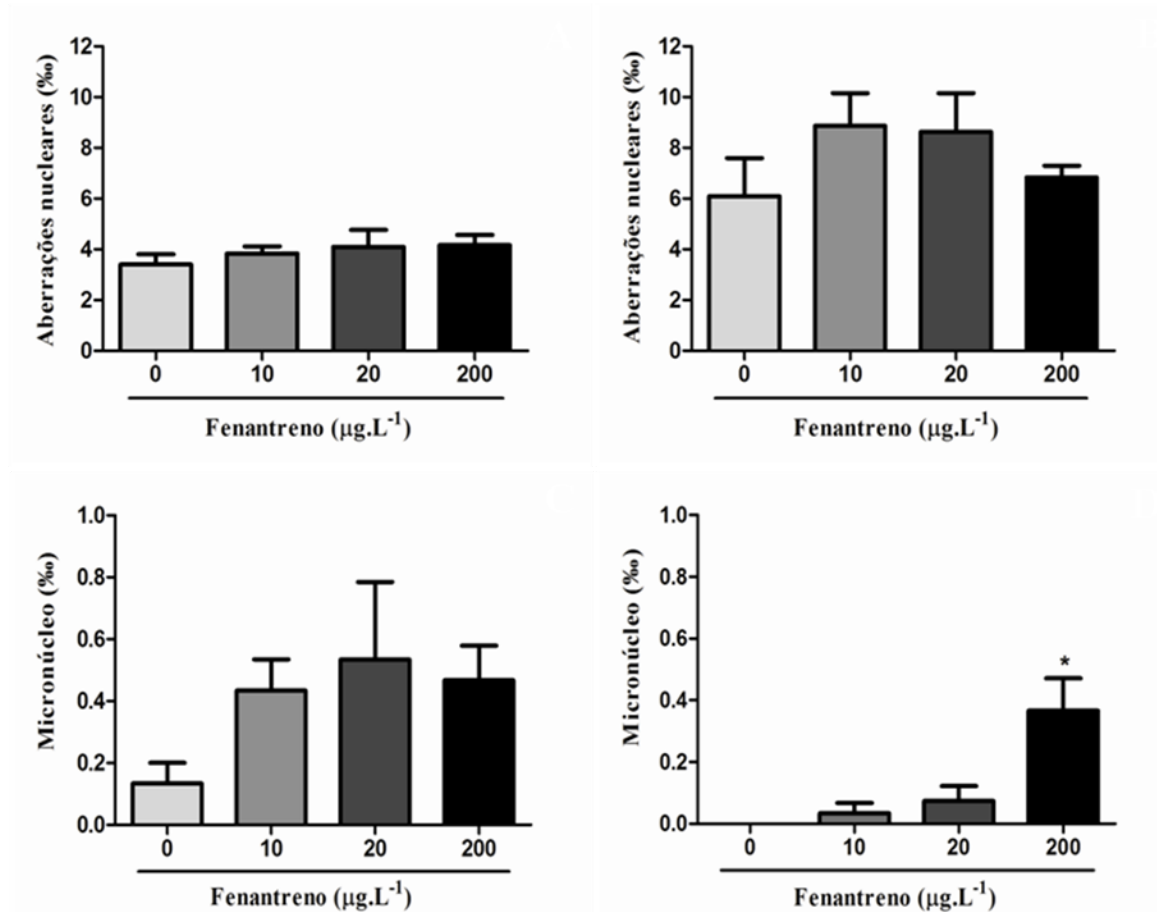


Figura 20. Variáveis genotóxicas. **(A)** Aberrações nucleares por mil células sanguíneas em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 24 horas; **(B)** Aberrações nucleares por mil células sanguíneas em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 96 horas; **(C)** Micronúcleos por mil células sanguíneas em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 24 horas; **(D)** Micronúcleos por mil células sanguíneas em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2.4 Variáveis morfológicas

4.2.4.1 Histopatologia de brânquias e rins

A figura 21A representa a estrutura normal do epitélio lamelar das brânquias de *P. lineatus*. As principais histopatologias encontradas em brânquias de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de fenantreno estão apresentadas na figura 21B-F. Nos dois períodos aos quais os animais foram expostos ao fenantreno, as histopatologias mais frequentes foram praticamente as mesmas: hipertrofia do epitélio lamelar, hiperplasia do epitélio lamelar, congestão vascular, constrição do sistema de células pilares e proliferação de células cloretos. A frequência encontrada em cada tipo de alteração analisada nas brânquias dos animais expostos ao fenantreno por 24 e 96

horas estão apresentados na tabela 7. As alterações histopatológicas mais frequentes em ambos os períodos de exposição foram classificadas como estágio de severidade I, sendo que as histopatologias de estágio de severidade II foram observadas com frequência somente no grupo exposto à concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, e as alterações de estágio III de severidade não foram observadas nas brânquias dos animais.

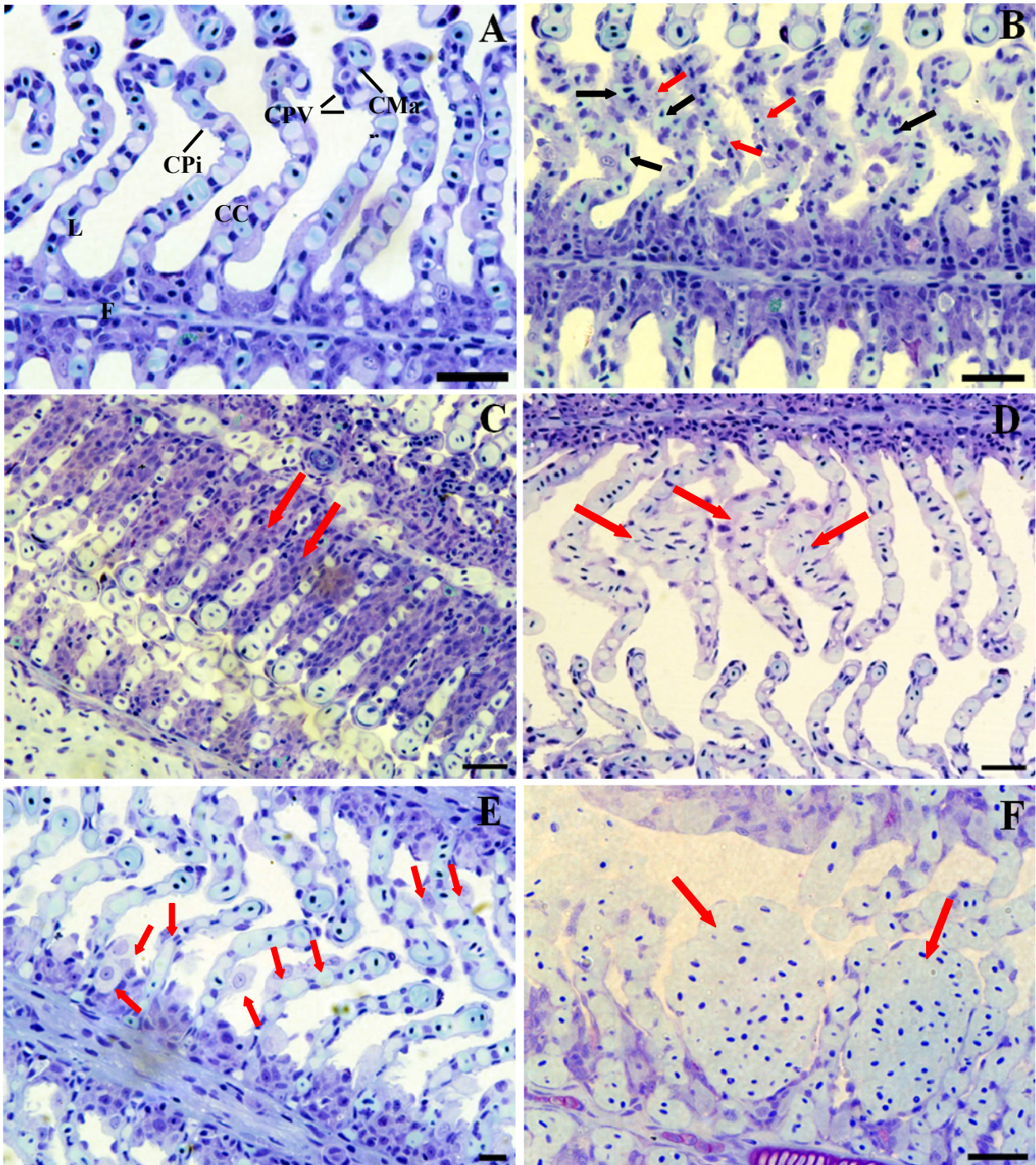


Figura 21. Fotomicrografia de brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de fenantreno. (A) Estrutura branquial normal indicando suas respectivas estruturas. (B) Seta pretas indicam

hipertrofia do epitélio lamelar e setas vermelhas, ruptura epitelial. (C) Hiperplasia e fusão de várias lamelas (setas vermelhas). (D) Congestão vascular (setas vermelhas). (E) Proliferação de células-cloreto (setas vermelhas). (F) Aneurisma (setas vermelhas). Abreviações: CMar = canal marginal; CPV = células pavimentosas; CPi = células pilares; CC = células-cloreto; L= lamela e F= filamento. Barra de escala = 20 μ m. Coloração = Azul de Toluidina.

Tabela 7. Frequências de alterações histopatológicas encontradas em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus* no grupo controle e expostos ao fenantreno por 24 e 96 horas.

Órgão Analisado	Alteração	Estágio	Controle		10 μ g.L ⁻¹		20 μ g.L ⁻¹		200 μ g.L ⁻¹	
			24h	96h	24h	96h	24h	96h	24h	96h
Brânquias	Hipertrofia do epitélio lamelar	I	+	0+	+	++	+	++	+	+++
	Hiperplasia do epitélio lamelar	I	+	+	+	+	+	++	+	++
	Fusão das lamelas	I	0	0	0+	+	0	+	0	+
	Dilatação capilar	I	+	++	+	++	+	++	+	+++
	Descolamento epitelial	I	0+	0	+	0	0+	0+	+	0+
	Constricção capilar	I	+	0	0+	0+	+	+	+	++
	Proliferação de células cloreto	I	+	+	+	+	+	+	+	+++
	Proliferação das cél. mucosas	I	0	0	0+	0	+	0	+	++
	Congestão vascular	I	+	0+	+	+	+	+	+	++
	Edema	I	0	0	+	0	0	0	+	0+
	Aneurisma lamelar	II	0+	0	0+	0	0	0	+	+
	Ruptura epitelial(hemorragia)	II	0	0	0	0	0	0	0+	0
	Necrose pontual	III	0	0	0	0	0	0	0	0
	Necrose total	III	0	0	0	0	0	0	0	0
Rim	Hipertrofia celular	I	0+	0+	0+	+	0+	++	+	++

Posterior	Hipertrofia nuclear	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Vacuolização celular	I	0	0+	0+	+	0+	+	0+	+
	Dilatação da luz tubular	I	0	0	0	0	0+	0	0+	0+
	Túbulos em regeneração	I	0	0	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Dilatação dos capilares	I	+	+	+	+	+	+	+	++
	Espessamento do endotélio capilar	I	0	0	0	0	0	0	0	0
	Aumento do volume glomerular	I	+	+	+	+	+	+	+	++
	Rompimento celular	II	0	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+
	Degeneração granular	II	+	+	+	+	+	++	+	+++
	Oclusão da luz tubular	II	0+	0+	+	+	+	++	+	+
	Degeneração tubular	II	0	0	0+	+	0+	+	0+	0+
	Novos néfrons	II	0	0	0	0	0	0	0	0
	Redução do espaço de Bowman	II	+	+	+	+	+	++	+	++
	Aumento do espaço de Bowman	II	0	0	0	0	0	0	0	0
	Presença de hemácias no espaço de Bowman	II	0	0	0	0	0	0	0	0
	Hemorragia	II	0+	0+	0+	0+	0+	0+	0+	+
	Gordura	II	0	0	0	0	0	0	0	0
Degeneração do tecido	II	0	0	0	0	0	0+	0	0	
Necrose	III	0	0	0	0	0+	0+	0+	+	

0=ausência; 0+ =raramente freqüente; + = freqüente; ++ =muito freqüente; +++ =extremamente freqüente

O VMA das brânquias dos animais expostos a 10; 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas foram $E_1= 1,62\pm 0,18$; $E_2= 1,62\pm 0,18$; $E_3= 1,75\pm 0,16$ e o IAH foram $E_1= 6,75\pm 1,19$; $E_2= 9,37\pm 2,71$; $E_3= 11\pm 2,70$, respectivamente, e não diferiram significativamente em relação o controle (VMA = $1,25\pm 0,16$ e IAH = $5,75\pm 1,49$, respectivamente) no mesmo período (Figura 22A e B). Os valores de IAH indicaram o funcionamento normal do órgão em todos os grupos, com exceção do grupo exposto à 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que indicou danos leves a moderados no órgão.

Nas brânquias dos animais expostos a 10, 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 horas, os valores de VMA aumentaram significativamente, com relação ao controle, na concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($C= 1,37\pm 0,18$; $E_1= 1,62\pm 0,18$; $E_2= 1,75\pm 0,18$; $E_3= 2$), o que representa a ocorrência de lesões pontualmente localizadas nos órgãos dos animais deste grupo. Da mesma forma, os valores do IAH nas brânquias aumentaram significativamente em comparação ao controle, somente no grupo exposto a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno ($C= 3,87\pm 0,47$; $E_1= 4,5\pm 0,26$; $E_2= 5,12\pm 0,35$; $E_3= 13,25\pm 1,59$), representando assim um funcionamento normal do órgão em todos os grupos, com exceção deste grupo, que apresentou um valor que indica danos leves a moderados nos órgãos (Figura 22C e D).

A figura 23 apresenta algumas características morfológicas normais dos rins de *P. lineatus* do grupo controle. As principais histopatologias encontradas em rins de *P. lineatus* expostos a diferentes concentrações de fenantreno são mostradas na Figura 24A-D. Nos dois períodos aos quais os animais foram expostos ao fenantreno, as histopatologias mais frequentes foram praticamente as mesmas, hipertrofia celular, degeneração granular, oclusão da luz tubular, dilatação dos capilares, aumento do volume glomerular e redução do espaço de Bowman. As frequências encontradas em cada tipo de alteração nos rins dos animais expostos estão apresentadas na Tabela 7. As alterações histopatológicas mais frequentes em ambos os períodos de exposição foram classificadas como estágio de severidade I e II, sendo que as histopatologias de estágio de severidade III foram observadas somente nos animais expostos a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 h.

Quanto aos resultados da análise histopatológica dos rins de *P. lineatus* expostos ao fenantreno, pôde-se observar que, apesar de ter ocorrido um aumento no IAH em todas as concentrações a que os animais foram expostos nos dois períodos de exposição, 24 ($C= 40,13 \pm 3,82$; $E_1= 46,25 \pm 1,62$; $E_2= 45,25 \pm 2,21$; $E_3= 59,88 \pm 11,06$) e 96 horas ($C= 40,13 \pm 2,75$; $E_1= 48,5 \pm 2,69$; $E_2= 58,63 \pm 11,05$; $E_3= 68,38 \pm 15,51$), as alterações não foram estatisticamente significativas. Os valores de IAH nos rins dos animais do experimento de 24 h indicaram alterações moderadas a severas em todos os grupos de concentrações, com exceção do grupo exposto a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, que indicou alterações severas nos órgãos. O IAH nos rins dos animais do experimento de

96 h indicaram alterações moderadas a severas nos grupos controle e expostos a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ e alterações severas nos outros dois grupos (20 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$) (Figura 22- F e H).

Os VMAs calculado para os rins dos animais expostos ao fenantreno foram significativamente mais altos no grupo exposto a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, nos dois períodos testados (24h - C= $1,75 \pm 0,16$; E₁= 2; E₂= $2,12 \pm 0,12$; E₃= $2,25 \pm 0,16$; 96h - C= $1,62 \pm 0,18$; E₁= 2; E₂= 2; E₃= $2,12 \pm 0,12$), indicando lesões pontualmente localizadas nestes grupos (Figura 22-E e G).

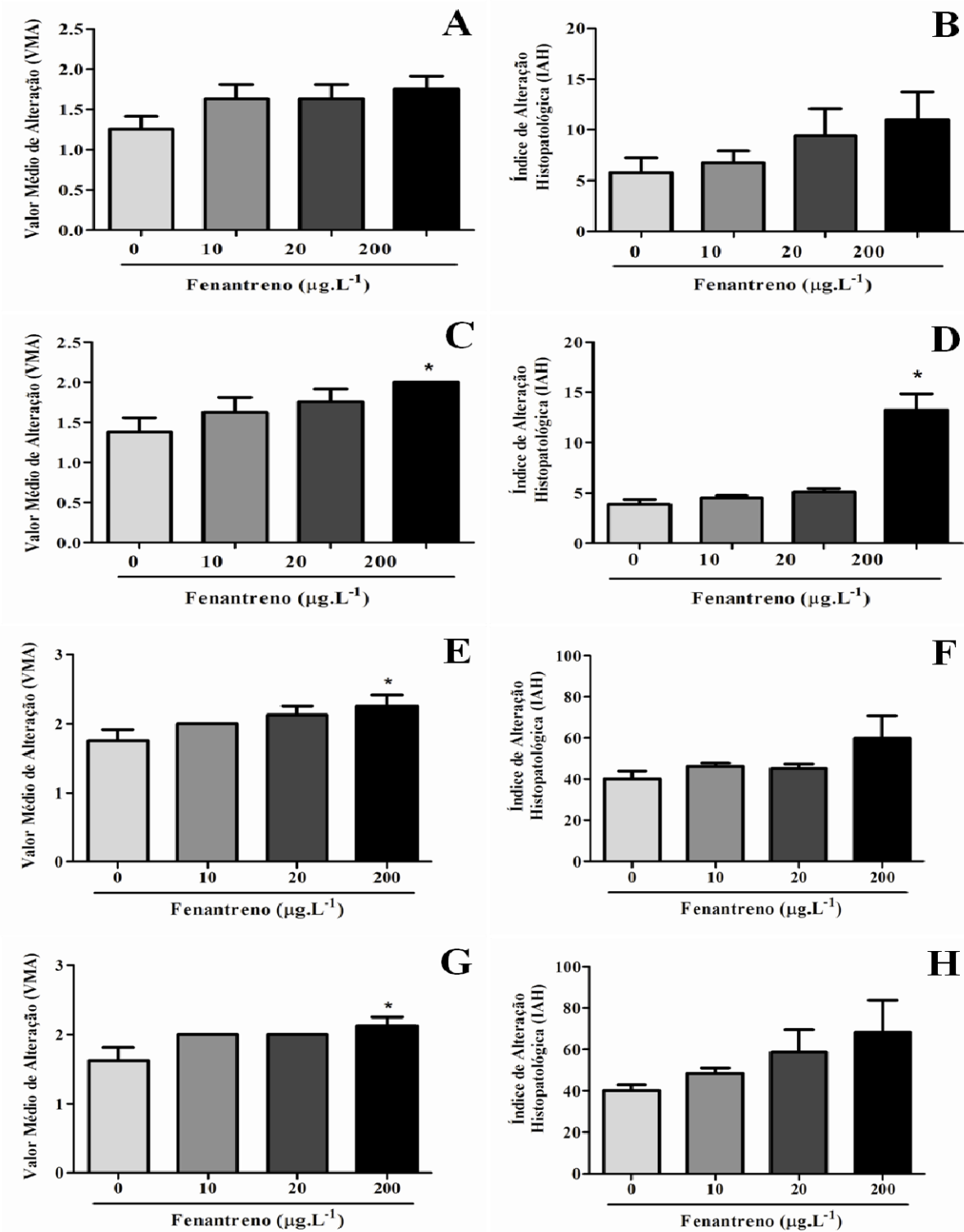


Figura 22. Valor Médio de Alteração (VMA) e Índice de Alteração Histopatológica (IAH) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. (A) VMA em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenanthreno por 24 horas. (B) IAH em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenanthreno por 24 horas. (C) VMA em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenanthreno por 96 horas. (D) IAH em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenanthreno por 96 horas. (E) VMA em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenanthreno por 24 horas. (F) IAH em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenanthreno por 24

horas. **(G)** VMA em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(H)** IAH em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

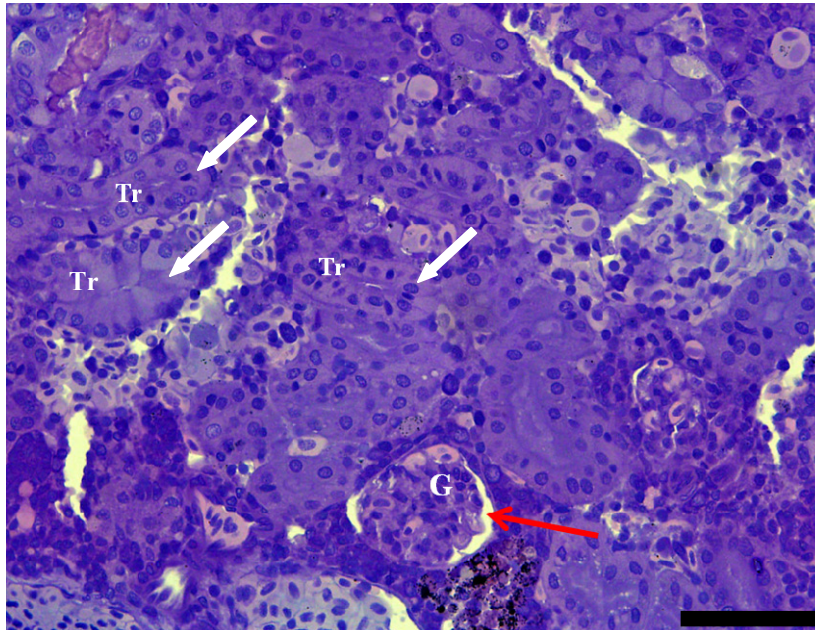


Figura 23. Fotomicrografia do rim de *Prochilodus lineatus* do grupo controle. Túbulos renais sem oclusão da luz tubular (setas brancas). Glomérulo com espaço de Bowman normal (seta vermelha). Abreviações: G= glomérulo; Tr= túbulo renal. Barra de escala = 20 μm . Coloração = Azul de Toluidina e fucsina básica.

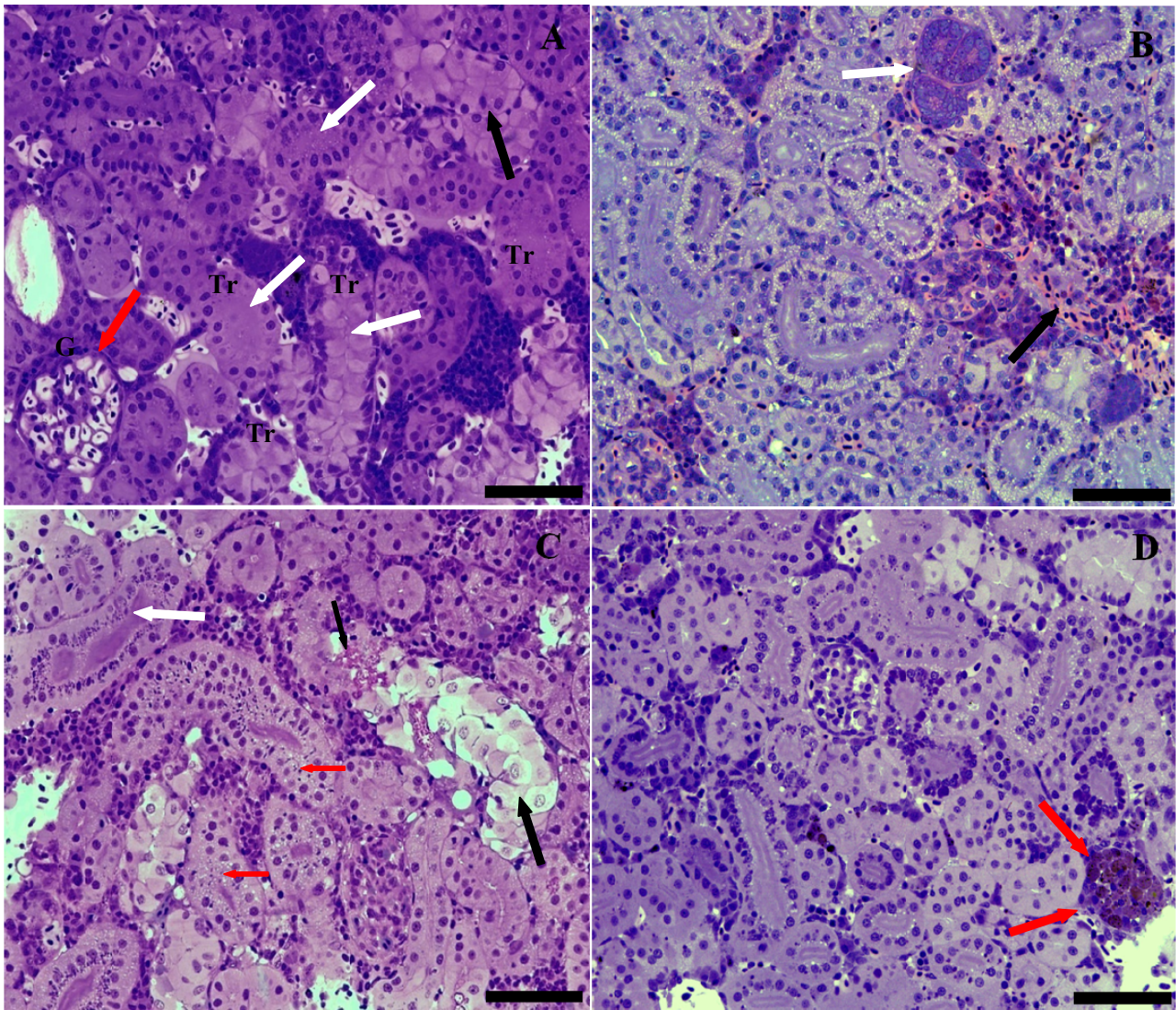


Figura 24. Fotomicrografia do rim de *Prochilodus lineatus* expostos a diferentes concentrações de fenantreno. **(A)** Estrutura do rim posterior e suas respectivas estruturas, apresentando algumas histopatologias. Redução no espaço de Bowman (seta vermelha); oclusão da luz tubular (setas brancas); hipertrofia celular (seta preta). **(B)** Novos néfrons (seta branca); hemorragia (seta preta). **(C)** Hipertrofia celular (seta preta), com descolamento epitelial (seta preta menor); degeneração granular (setas vermelhas); oclusão da luz tubular (seta branca). **(D)** Necrose (setas vermelhas). Abreviações: G= glomérulo; Tr= túbulo renal. Barra de escala = 20 μ m. Coloração = Azul de Toluidina e fucsina básica.

4.2.4.2 Imunohistoquímica de brânquias e rins

Quanto ao número de células-cloreto observado por imunomarcção no filamento e lamelas de brânquias de *P. lineatus* (Figura 25A e B), não foram observadas diferenças significativas nos animais expostos ao fenantreno por 24 horas, com relação ao grupo controle (Lamelas: C= $1594 \pm 385,2$ CC.mm⁻²; E₁= $1643 \pm 240,5$ CC.mm⁻²; E₂= 1529 ± 444 CC.mm⁻²;

$E_3 = 1361 \pm 95,03 \text{ CC.mm}^{-2}$; Filamento: $C = 1543 \pm 155,4 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1 = 1480 \pm 202,9 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2 = 1589 \pm 301,1 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3 = 1450 \pm 100,2 \text{ CC.mm}^{-2}$). Já nos animais expostos ao fenantreno por 96 horas foram observadas diferenças significativas apenas nas células-cloreto dos filamentos brânquiais daqueles expostos a 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 horas, as quais apresentaram uma diminuição em seu número comparado ao grupo controle ($C = 1811 \pm 135,3 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1 = 1642 \pm 280,6 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2 = 1165 \pm 115,9 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3 = 779,3 \pm 69,57 \text{ CC.mm}^{-2}$). Neste mesmo período de exposição, não ocorreram diferenças significativas no número de células-cloreto nas lamelas das brânquias dos animais expostos ao fenantreno, com relação ao grupo controle ($C = 1306 \pm 48,31 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1 = 1667 \pm 177,8 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2 = 1063 \pm 26,6 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3 = 1040 \pm 109,2 \text{ CC.mm}^{-2}$) (Figura 26A e B).

Nos rins de *P. lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas, nenhum grupo apresentou diferenças significativas no número de células-cloreto, observado através de imunomarcção, comparado ao grupo controle no mesmo período ($C = 8896 \pm 431,4 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1 = 9502 \pm 1282 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2 = 9529 \pm 887,8 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3 = 8957 \pm 456,4 \text{ CC.mm}^{-2}$). Já nos rins dos animais expostos ao fenantreno por 96 horas, o número de células-cloreto diferiu significativamente apenas nos animais expostos a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 horas, nos quais ocorreu um aumento no número destas células com relação ao controle no mesmo período ($C = 10258 \pm 626,3 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1 = 11302 \pm 545,2 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2 = 11654 \pm 367,4 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3 = 12909 \pm 523,3 \text{ CC.mm}^{-2}$) (Figura 25C e D; Figura 26C e D).

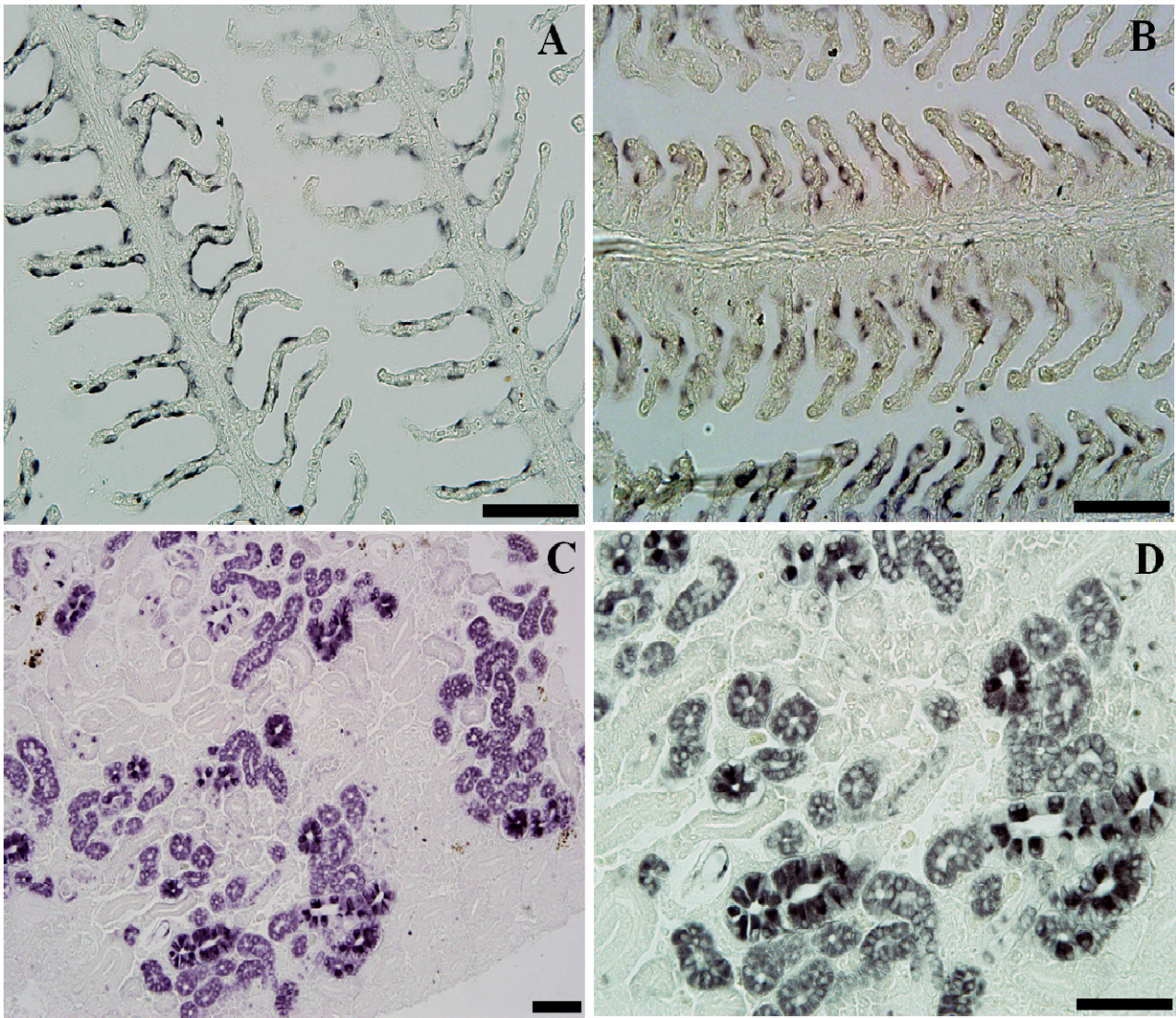


Figura 25. Fotomicrografias mostrando as células-cloreto branquiais e renais coradas através da imunohistoquímica contra $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$. **(A)** Imunohistoquímica contra $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ das células-cloreto branquiais de *Prochilodus lineatus* do grupo controle. **(B)** Imunohistoquímica contra $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ das células-cloreto branquiais de *Prochilodus lineatus* do grupo exposto a $200\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas. **(C)** Imunohistoquímica contra $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ das células-cloreto do rim de *Prochilodus lineatus* do grupo controle. **(D)** Imunohistoquímica contra $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ das células-cloreto do rim de *Prochilodus lineatus* do grupo exposto a $200\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 horas. Barra de escala = $20\mu\text{m}$.

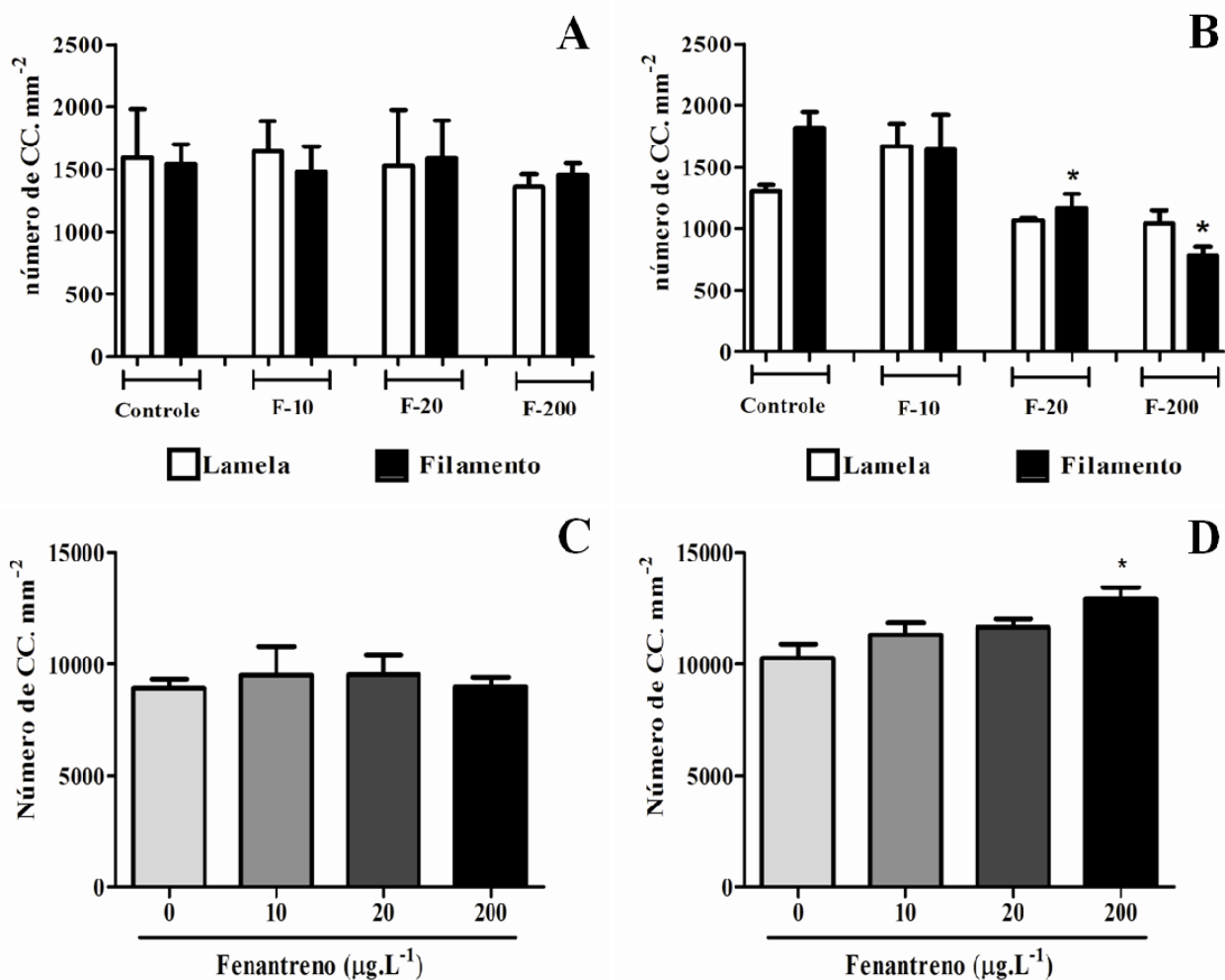


Figura 26. Número de células-cloreto observadas em brânquias e rins através de imunohistoquímica contra Na⁺/K⁺-ATPase. **(A)** Número de células-cloreto (CC) por mm² nos filamentos e lamelas branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas; **(B)** Número de células-cloreto (CC) por mm² nos filamentos e lamelas branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Número de células-cloreto (CC) por mm² em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Número de células-cloreto (CC) por mm² em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2.4.3 Densidade e área fracional de células-cloreto (CC) em brânquias

Quanto aos valores da densidade e área fracional das células-cloreto nas brânquias, determinados por microscopia eletrônica de varredura, foram observadas diferenças significativas nos valores da área fracional, nos animais expostos a 10 e 200 µg.L⁻¹ de fenantreno durante 24 horas, os quais aumentaram com relação ao controle no mesmo período ($C = 3,41 \pm 0,42 \%$; $E_1 = 8,83 \pm 1,22 \%$; $E_2 = 4,56 \pm 0,35 \%$; $E_3 = 7,13 \pm 0,6 \%$), enquanto que os animais expostos ao fenantreno

por 96 horas apresentaram uma diminuição significativa, somente no grupo exposto a maior concentração, 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$, comparado ao controle no mesmo período ($C= 3,56 \pm 0,44 \%$; $E_1=3,77 \pm 0,53 \%$; $E_2=2,87 \pm 0,41 \%$; $E_3= 2,01 \pm 0,24 \%$) (Figura 27A e B).

Os valores encontrados para densidade de células cloreto nos animais expostos ao fenantreno diferiram significativamente do controle somente no grupo exposto a concentração de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas, com uma diminuição período ($C= 629,8 \pm 0,73 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1=628,3 \pm 0,24 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2=628,2 \pm 0,3 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3= 626,8 \pm 0,3 \text{ CC.mm}^{-2}$). Nos animais expostos ao fenantreno por 96 horas não foram observadas diferenças significativas nos valores de densidade de células cloreto, comparado ao controle no mesmo período ($C= 630,1 \pm 0,74 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_1=629 \pm 0,26 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_2=629,5 \pm 0,5 \text{ CC.mm}^{-2}$; $E_3= 629,7 \pm 0,65 \text{ CC.mm}^{-2}$) (Figura 27C e D).

A figura 28 mostra a morfologia da superfície do epitélio de um filamento branquial de *P. lineatus*, através de eletromicrografia captada utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As células-cloreto (CC) diferem das células pavimentosas (CPVs) por apresentarem a membrana apical côncava, com projeções no epitélio apical, conferindo a elas um aspecto de esponja.

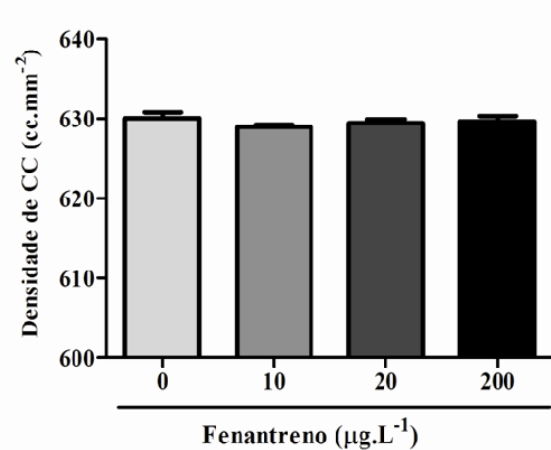
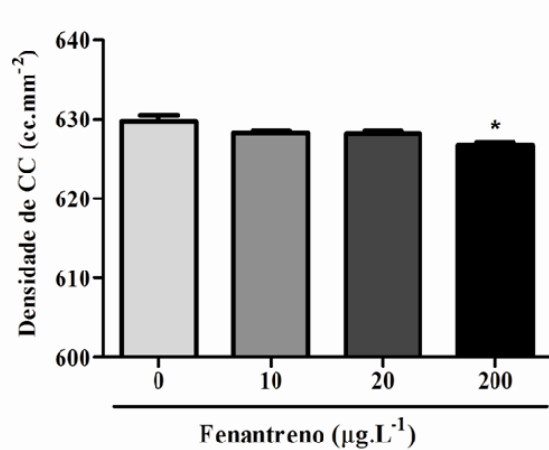
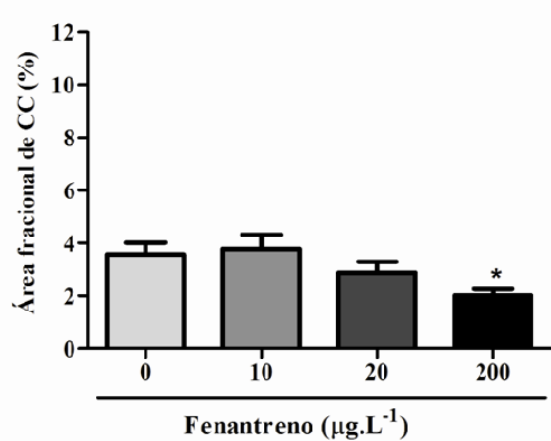
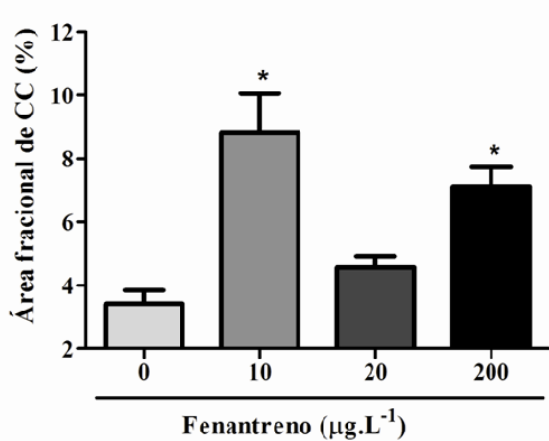


Figura 27. Densidade e área fracional de células-cloreto encontradas em brânquias através de microscopia eletrônica de varredura. **(A)** Área Fracional de Células-Cloreto (AFCC) (%) em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 24 horas; **(B)** Área Fracional de Células-Cloreto (AFCC) (%) em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 96 horas; **(C)** Densidade de Células-Cloreto (CC.mm^{-2}) em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 24 horas; **(D)** Densidade de Células-Cloreto (CC.mm^{-2}) em *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno durante 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

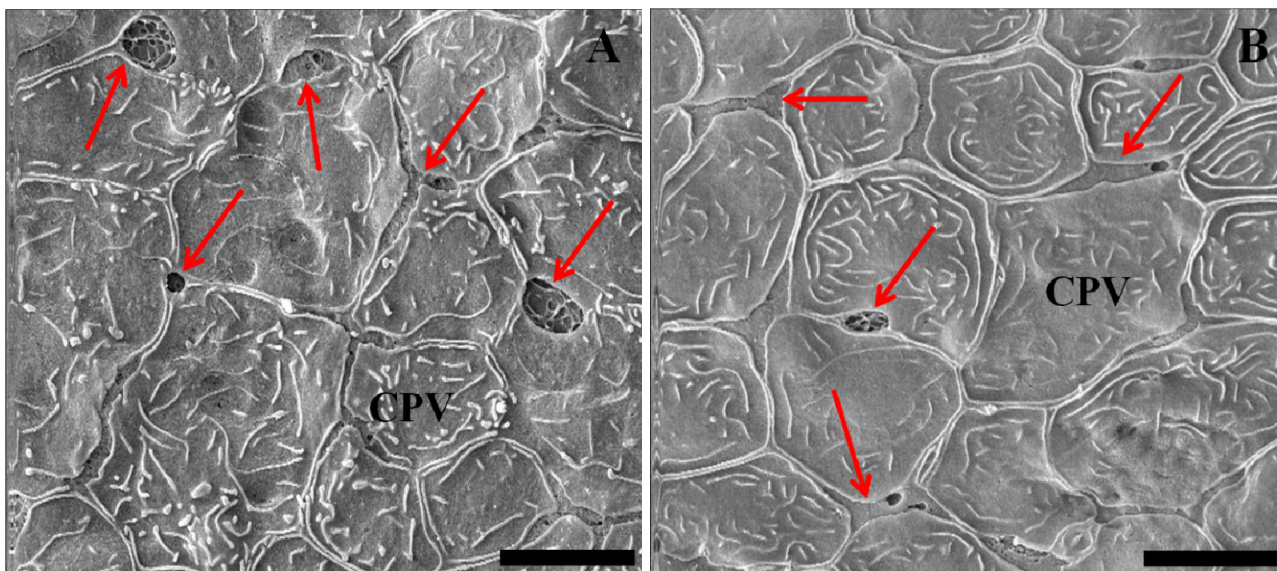


Figura 28. Eletromicrografias de varredura da superfície do epitélio do filamento branquial de *Prochilodus lineatus*. (A) Grupo controle e (B) Grupo exposto a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ por 96 horas. Setas vermelhas indicam as células-cloreto. CPV= células pavimentosas. Barra de escala=10 μm .

4.2.5 Variáveis bioquímicas

4.2.5.1 Atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase (NKA) em brânquias e rins

A atividade específica da NKA nas brânquias de *P. lineatus* diminuiu significativamente nos animais expostos às concentrações de 20 e $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas ($E_1 = 5,04 \pm 0,92 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_2 = 3,2 \pm 0,54 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_3 = 3,17 \pm 0,79 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$), comparado ao controle no mesmo período ($C = 6,67 \pm 1,37 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e aumentou significativamente no grupo exposto a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 h ($E_1 = 2,41 \pm 0,74 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_2 = 4,37 \pm 2,0 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_3 = 5,64 \pm 1,18 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$), com relação ao controle no mesmo período ($C = 0,82 \pm 0,23 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (Figura 29A e B).

Quanto a atividade específica da NKA, tanto nos rins de *P. lineatus* expostos à 24 h ($C = 1,32 \pm 0,29 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_1 = 2,59 \pm 0,55 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_2 = 2,47 \pm 0,94 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_3 = 4,04 \pm 0,6 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$) como naqueles expostos à 96 h ($C = 1,45 \pm 0,34 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_1 = 1,0 \pm 0,15 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_2 = 2,74 \pm 0,75 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$; $E_3 = 3,51 \pm 0,73 \mu\text{mol Pi.mg Pt}^{-1}.\text{h}^{-1}$) houve um aumento significativo no grupo exposto a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno, com relação ao controle no mesmo período (Figura 29C e D).

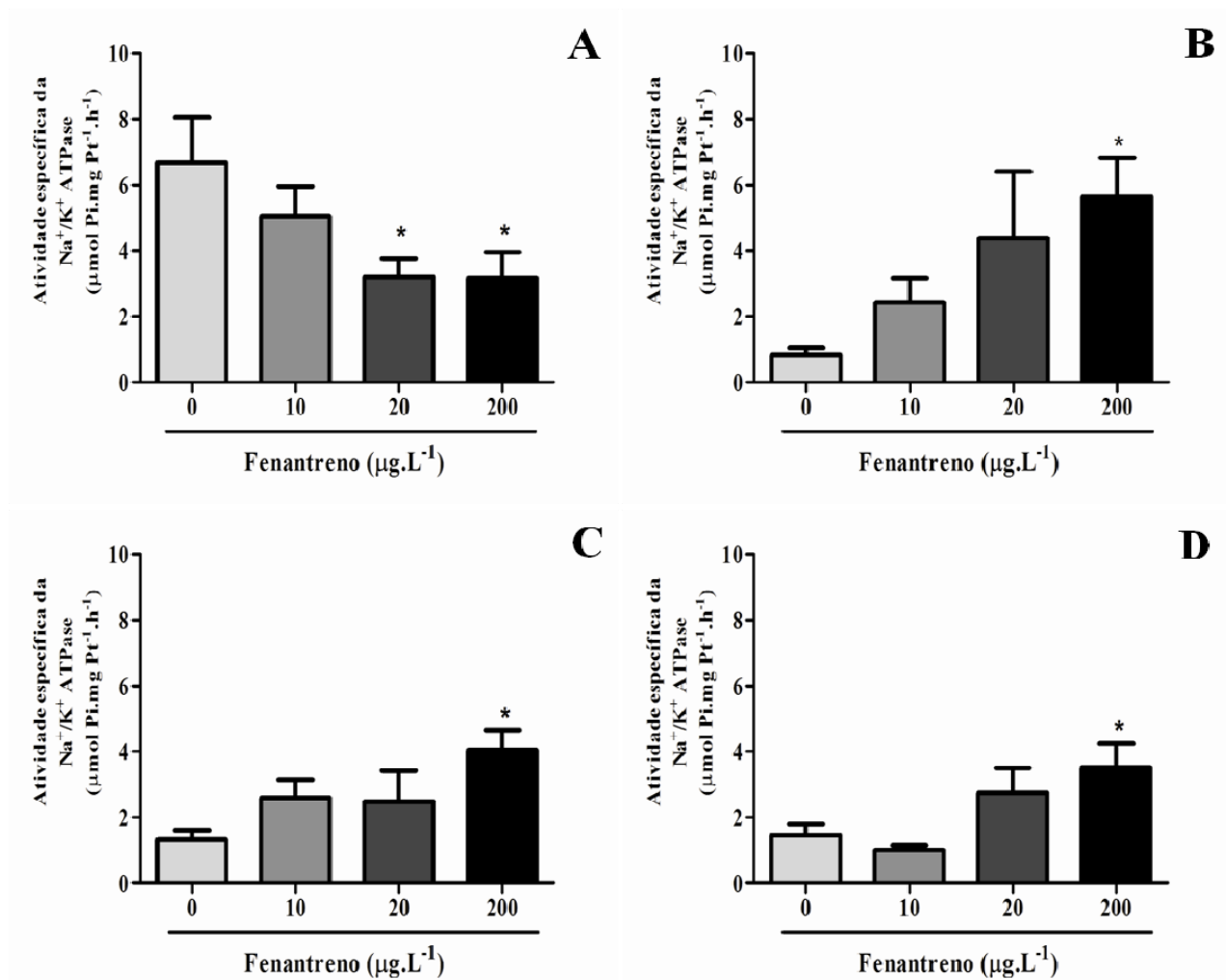


Figura 29. Atividade específica da Na⁺/K⁺ ATPase (µmol Pi.mg Pt⁻¹.h⁻¹) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Atividade específica da Na⁺/K⁺ ATPase (µmol Pi.mg Pt⁻¹.h⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Atividade específica da Na⁺/K⁺ ATPase (µmol Pi.mg Pt⁻¹.h⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Atividade específica da Na⁺/K⁺ ATPase (µmol Pi.mg Pt⁻¹.h⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Atividade específica da Na⁺/K⁺ ATPase (µmol Pi.mg Pt⁻¹.h⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle (p < 0,05).

4.2.5.2 Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) em brânquias e rins

Os valores da atividade da enzima AC nas brânquias de *P. lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas ($E_1 = 20,66 \pm 4,02$ U mg Pt⁻¹; $E_2 = 21,6 \pm 3,42$ U mg Pt⁻¹; $E_3 = 17,92 \pm 5$ U mg Pt⁻¹) não diferiram significativamente em comparação ao do grupo controle no mesmo período ($C = 13,5 \pm 0,74$ U mg Pt⁻¹). Contudo, a atividade branquial da AC diminuiu significativamente em todas as concentrações nos animais expostos por 96 h ($E_1 = 7,0 \pm 1,17$ U mg Pt⁻¹; $E_2 = 6,13 \pm 0,97$ U mg Pt⁻¹; $E_3 = 7,3 \pm 0,25$ U mg Pt⁻¹), em relação ao controle no mesmo período ($C = 14,71 \pm 3,22$ U mg Pt⁻¹) (Figura 30A e B).

A atividade renal da enzima AC em *P. lineatus* foi mais baixa do que nas brânquias. Não houve diferenças significativas entre os animais expostos ao fenantreno por 24 horas ($E_1 = 1,99 \pm 0,43$ U mg Pt⁻¹; $E_2 = 1,64 \pm 0,44$ U mg Pt⁻¹; $E_3 = 1,68 \pm 0,53$ U mg Pt⁻¹), e o grupo controle no mesmo período ($C = 1,5 \pm 0,28$ U mg Pt⁻¹). Nos animais expostos ao fenantreno por 96 h, houve um aumento significativo da AC somente no grupo exposto a 200 µg.L⁻¹ de fenantreno ($E_1 = 1,56 \pm 0,22$ U mg Pt⁻¹; $E_2 = 1,28 \pm 0,26$ U mg Pt⁻¹; $E_3 = 3,36 \pm 0,19$ U mg Pt⁻¹) com relação ao controle no mesmo período ($C = 1,58 \pm 0,41$ U mg Pt⁻¹) (Figura 30C e D).

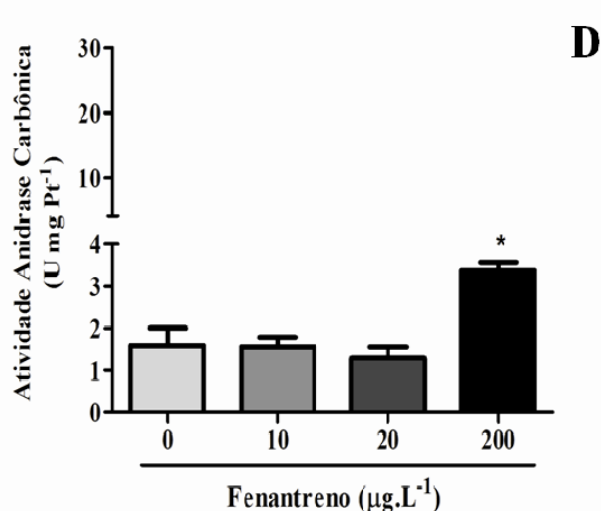
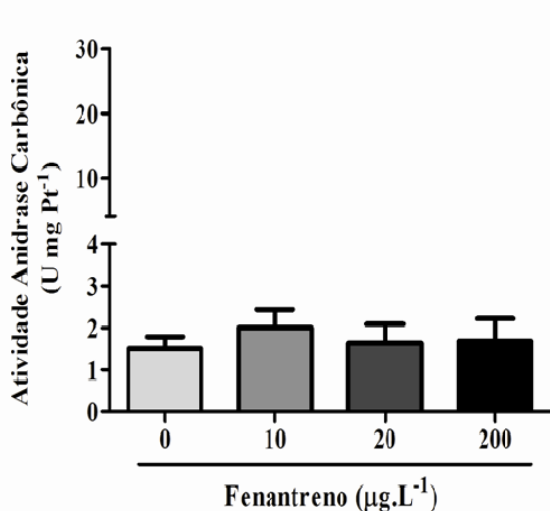
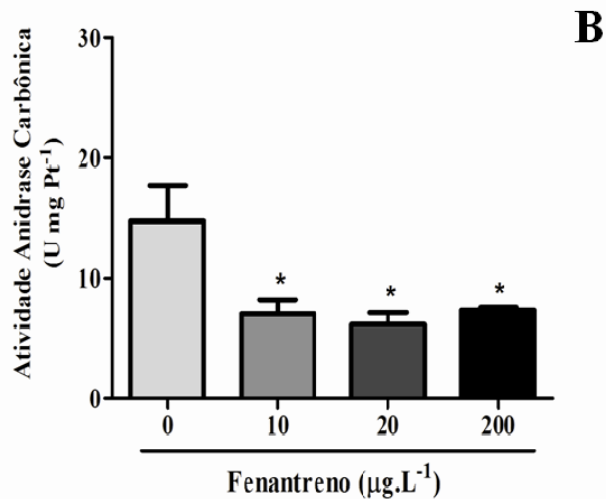
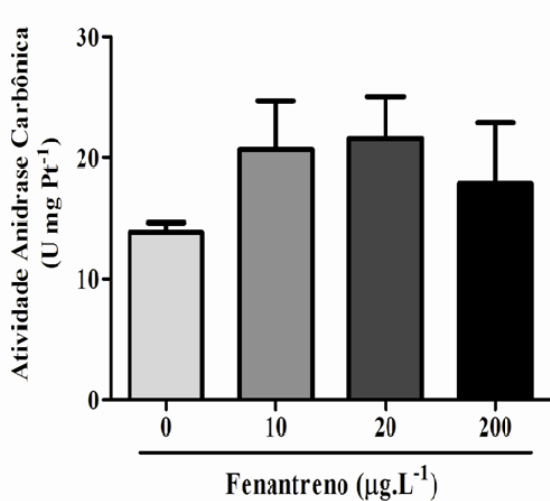


Figura 30. Atividade da anidrase carbônica (U mg Pt⁻¹) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Atividade da anidrase carbônica (U mg Pt⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Atividade da anidrase carbônica (U mg Pt⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Atividade da anidrase carbônica (U mg Pt⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Atividade da anidrase carbônica (U mg Pt⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2.5.3 Atividade das enzimas de estresse oxidativo em brânquias e rins

4.2.5.3.1 Superóxido dismutase total – SOD

Tanto nas brânquias quanto nos rins dos animais expostos ao fenantreno por 24 horas não foram observadas diferenças significativas nos valores da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), com relação ao controle (Brânquias: C= $44,37 \pm 0,92$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₁= $42,3 \pm 1,98$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₂= $42,7 \pm 1,76$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₃= $49,08 \pm 5,41$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} , Rim: C= $47,49 \pm 6,75$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₁= $56,03 \pm 5,3$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₂= $55,71 \pm 3,15$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₃= $53,6 \pm 5,61$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1}). Contudo nos animais expostos ao fenantreno durante 96 horas, houve uma diminuição significativa da atividade da SOD nas brânquias dos animais expostos a 20 e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno (C= $64,55 \pm 4,31$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₁= $47,09 \pm 7,05$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₂= $28,11 \pm 2,11$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₃= $39,9 \pm 5,08$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1}) e nos rins dos animais expostos a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (C= $79,78 \pm 12,78$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₁= $61,66 \pm 7,4$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₂= $69,27 \pm 6,8$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1} ; E₃= $31,19 \pm 3,08$ U SOD min^{-1} mgPt^{-1}), com relação ao controle no mesmo período (Figura 31).

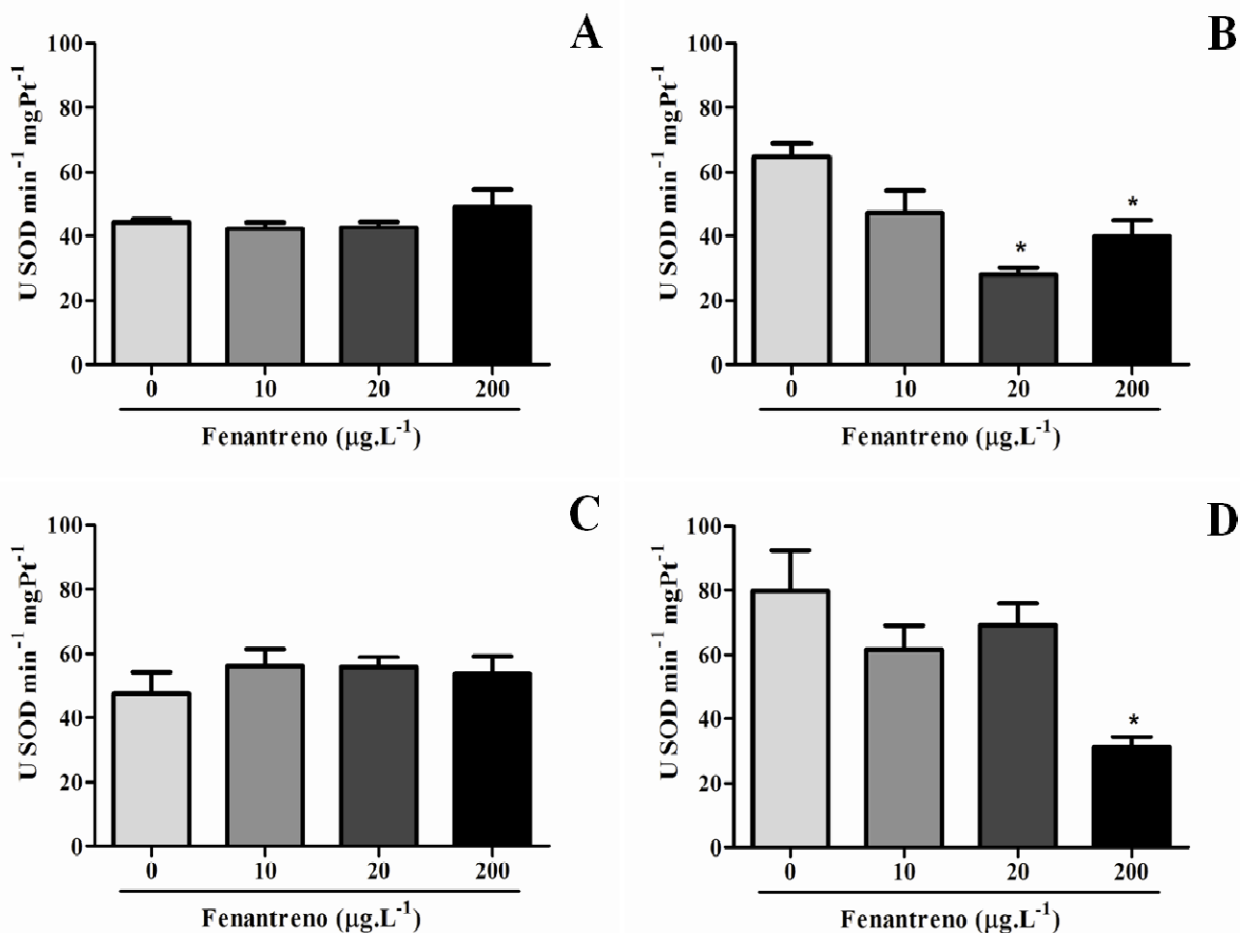


Figura 31. Atividade da superóxido dismutase (U SOD min⁻¹ mgPt⁻¹) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Atividade da superóxido dismutase (U SOD min⁻¹ mgPt⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Atividade da superóxido dismutase (U SOD min⁻¹ mgPt⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Atividade da superóxido dismutase (U SOD min⁻¹ mgPt⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Atividade da superóxido dismutase (U SOD min⁻¹ mgPt⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle (p < 0,05).

4.2.5.3.2 Catalase – CAT

Os valores da atividade da enzima catalase não apresentaram diferenças significativas entre o controle e os grupos expostos ao fenantreno durante 24 horas tanto nas brânquias quanto nos rins dos animais (Brânquias: C= $5,9 \pm 0,87 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₁= $3,83 \pm 1,23 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₂= $6,12 \pm 1,64 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₃= $6,61 \pm 1,26 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$, Rim: C= $9,76 \pm 1,89 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₁= $9,95 \pm 1,64 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₂= $11,77 \pm 1,21 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₃= $11,12 \pm 1,36 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$). Já nos animais expostos ao fenantreno por 96 horas, a atividade desta enzima decresceu significativamente nas brânquias dos animais expostos a maior concentração, $200 \mu\text{g.L}^{-1}$, (C= $9,71 \pm 1,84 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₁= $7 \pm 1 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₂= $8,51 \pm 1,66 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₃= $3,58 \pm 0,35 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$) e aumentou significativamente nos rins dos animais deste mesmo grupo (C= $8,98 \pm 1,29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₁= $7,94 \pm 0,97 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₂= $10,68 \pm 0,73 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$; E₃= $12,92 \pm 1,18 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$), em comparação ao grupo controle no mesmo período (Figura 32).

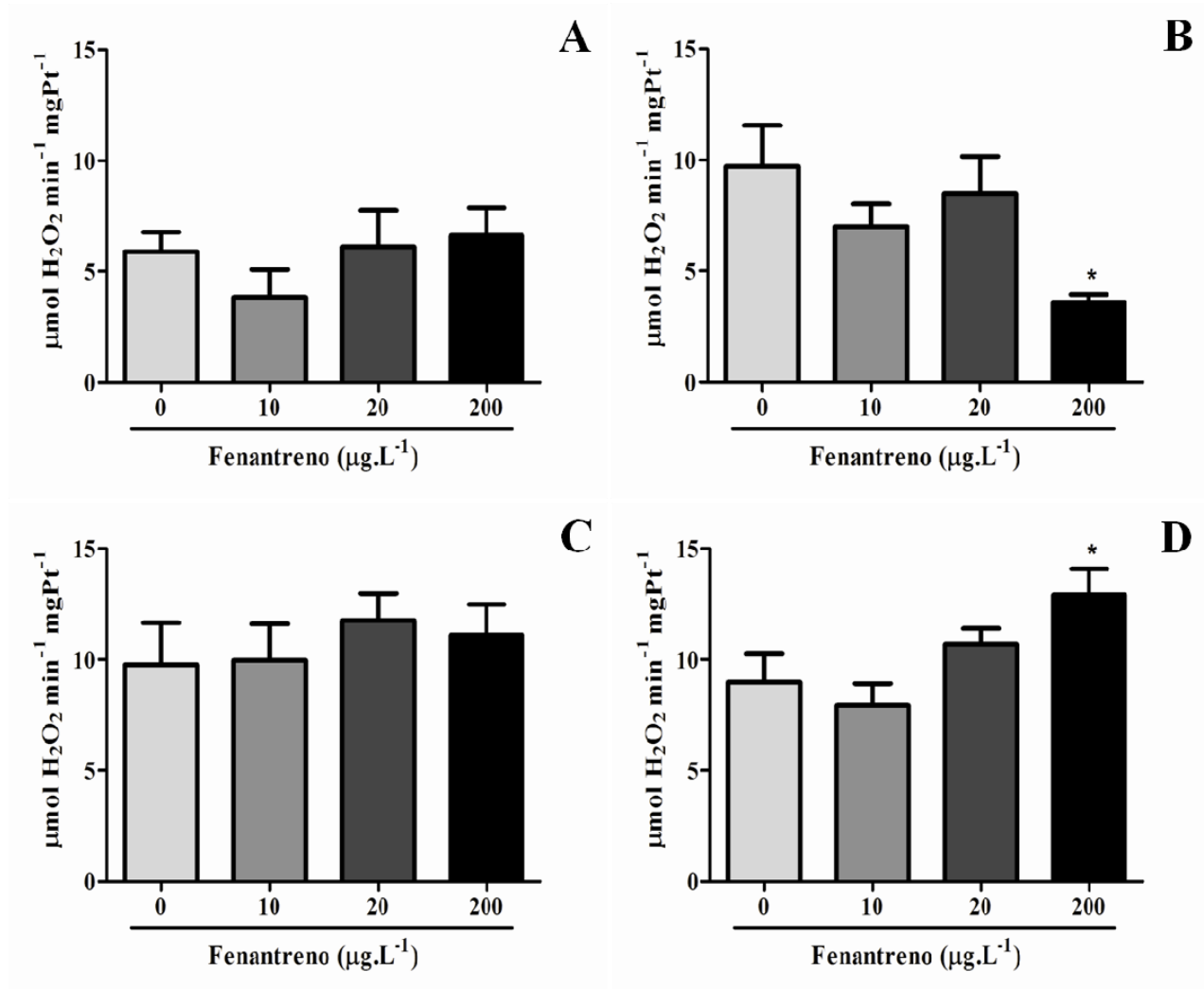


Figura 32. Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. (A)

Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. (B) Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. (C) Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. (D) Atividade da catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2.5.3.3 Glutationa peroxidase – GPx

Os valores da atividade branquial da glutathione peroxidase nos animais expostos ao fenantreno por 24 horas não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle, apesar de ter ocorrido uma tendência de aumento na concentração de $200\mu\text{g.L}^{-1}$ (C= $56,57 \pm 6,58 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₁= $44,51 \pm 5,12 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₂= $48,58 \pm 4,07 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₃= $79,43 \pm 19,89 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$). Nas brânquias dos animais expostos ao fenantreno por 96 horas, os valores da atividade da glutathione peroxidase também não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle (C= $44,95 \pm 6,08 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₁= $63,65 \pm 8,81 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₂= $64,15 \pm 4,22 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₃= $62,62 \pm 8,14 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) (Figura 33A e B)

Nos rins dos animais expostos ao fenantreno, os valores da atividade desta enzima não diferiram significativamente do grupo controle, nos dois períodos de exposição (24h: C= $60,68 \pm 8,38 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₁= $59,12 \pm 9,38 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₂= $69,68 \pm 6,11 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₃= $58,98 \pm 3 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$, 96h: C= $68,51 \pm 9,73 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₁= $42,06 \pm 4,86 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₂= $85,36 \pm 12,7 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$; E₃= $64,68 \pm 6,27 \mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) (Figura 33C e D).

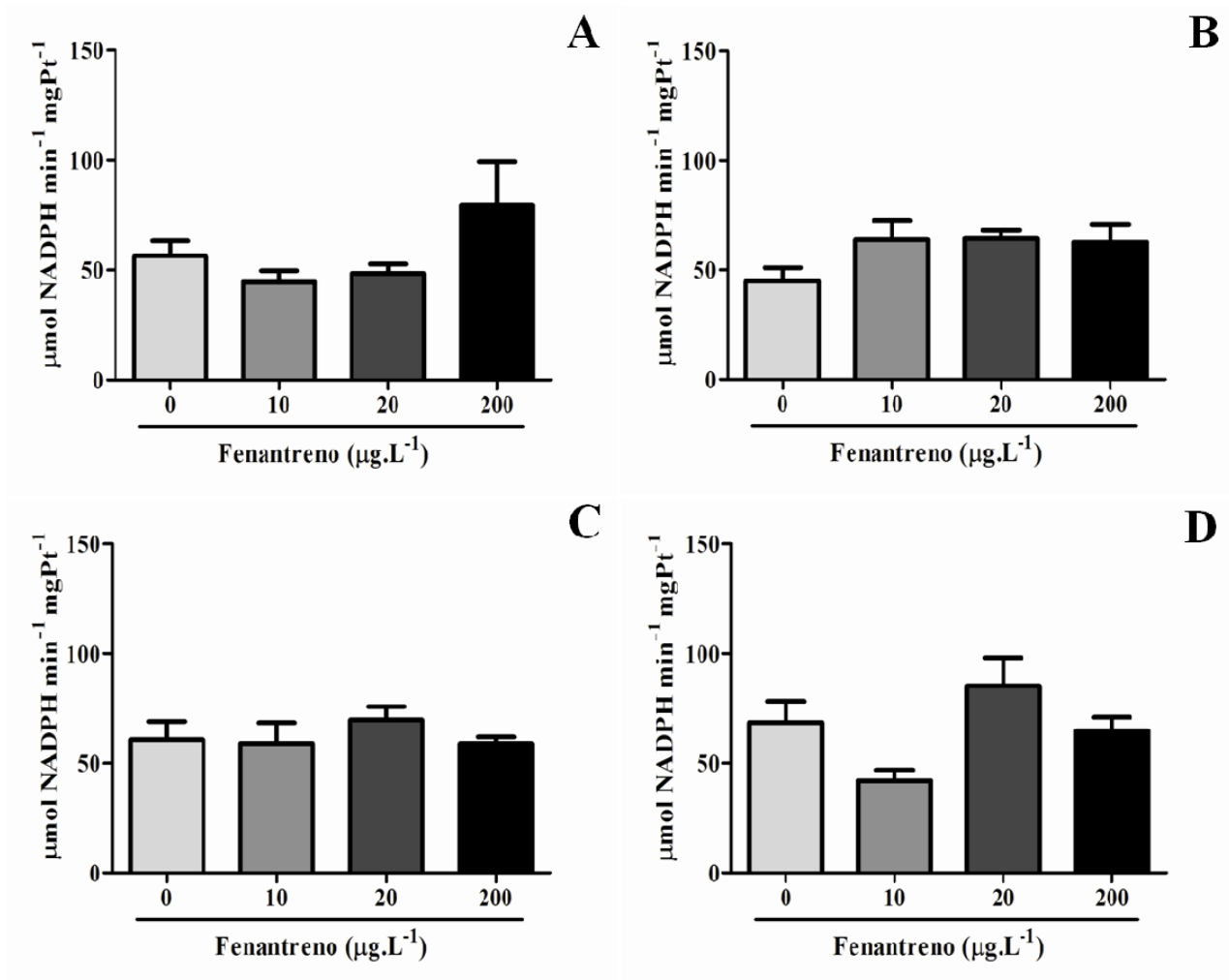


Figura 33. Atividade da glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Atividade da glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Atividade da glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Atividade da glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Atividade da glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol NADPH min}^{-1} \text{mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2.5.3.4 Glutationa reduzida – GSH

Nas brânquias dos animais expostos ao fenantreno por 24 horas, as concentrações de dissulfeto de glutaciona (GSH) não diferiram significativamente das concentrações dos animais do grupo controle (C= $10,81 \pm 2,67 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₁= $11,12 \pm 2 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₂= $10,91 \pm 2,72 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₃= $11,48 \pm 2,92 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$), assim como as brânquias dos animais expostos ao fenantreno por 96 horas, que também não apresentaram diferenças significativas na concentração de GSH quando comparado ao grupo controle no mesmo período (C= $7,33 \pm 1,36 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₁= $8,05 \pm 1,8 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₂= $10,89 \pm 1,58 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₃= $11,73 \pm 1,41 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) (Figura 34A e B).

As concentrações de dissulfeto de glutaciona (GSH) nos rins de *P. lineatus* também não diferiram significativamente com relação ao grupo controle no mesmo período, nos animais expostos ao fenantreno por 24 horas (C= $8,49 \pm 1,63 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₁= $9,86 \pm 2,44 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₂= $8,03 \pm 1,62 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₃= $10,21 \pm 2,1 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) ou 96 horas (C= $11,19 \pm 1,66 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₁= $10,84 \pm 1,64 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₂= $11,85 \pm 2,92 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$; E₃= $13,36 \pm 2,95 \mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) (Figura 34C e D).

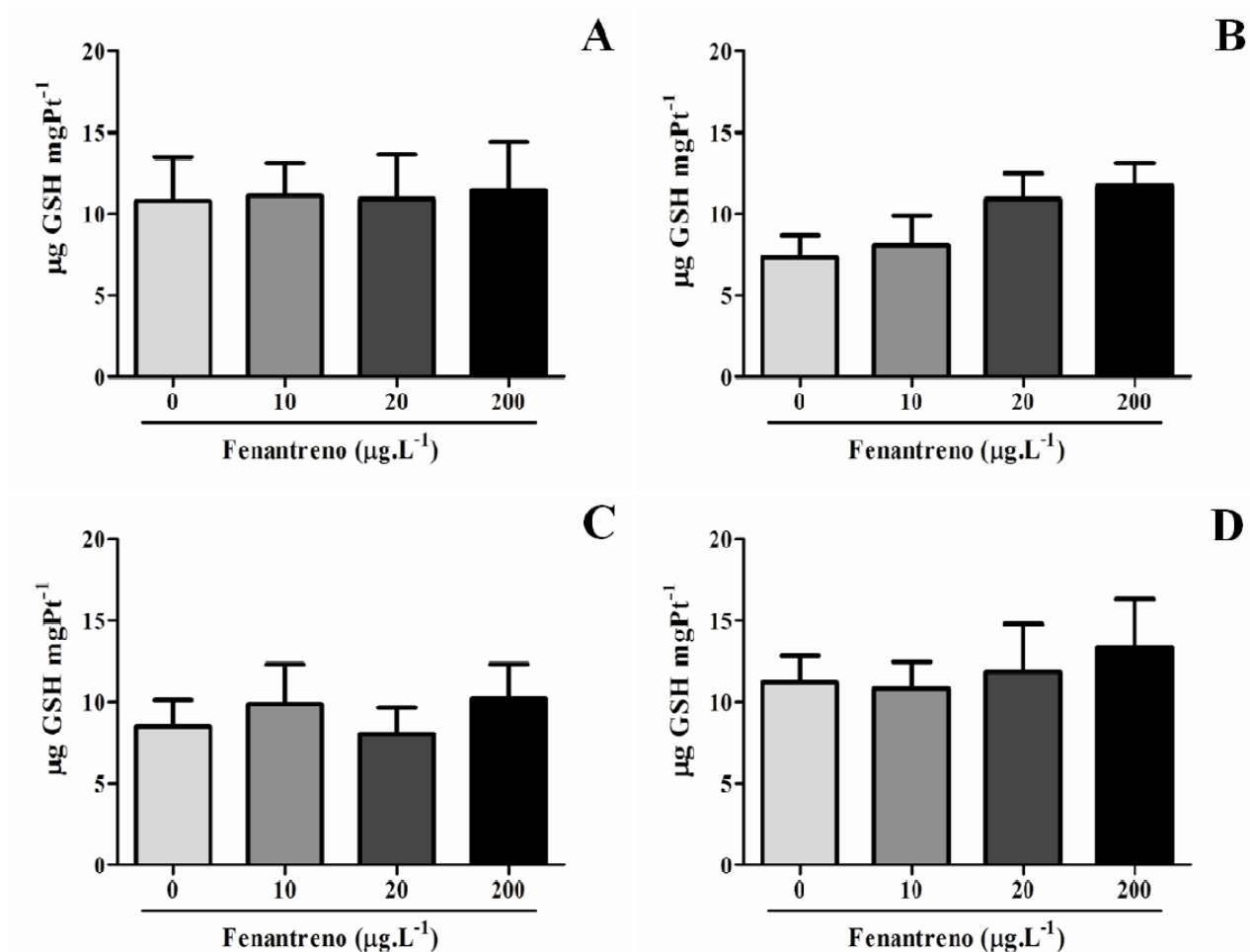


Figura 34. Concentrações de dissulfeto de glutaciona ($\mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Concentrações de dissulfeto de glutaciona ($\mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Concentrações de dissulfeto de glutaciona ($\mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Concentrações de dissulfeto de glutaciona ($\mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Concentrações de dissulfeto de glutaciona ($\mu\text{g GSH mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

4.2.5.3.5 Glutathione S-transferase – GST

Os valores de atividade da glutathione S-transferase nas brânquias de *P. lineatus* expostos ao fenantreno durante 24 ou 96 horas, não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle no mesmo período (24h: C= $33,11 \pm 3,66$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₁= $32,16 \pm 4,15$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₂= $40 \pm 4,81$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₃= $47,29 \pm 3,83$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$, 96h: C= $55,5 \pm 5,22$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₁= $62,95 \pm 3,49$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₂= $60,95 \pm 4,8$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₃= $53,54 \pm 3,87$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$) (Figura 35A e B).

Já nos rins de *P. lineatus* expostos ao fenantreno, ocorreram diferenças significativas na atividade desta enzima somente nos animais expostos a $200\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 horas, os quais apresentaram um aumento significativo quando comparado ao grupo controle (24h: C= $45,76 \pm 2,1$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₁= $63,66 \pm 7,56$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₂= $49,53 \pm 3,14$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₃= $74,07 \pm 5,85$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$, 96h: C= $63,53 \pm 5,07$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₁= $63,34 \pm 2,64$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₂= $58,82 \pm 6,74$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$; E₃= $78,01 \pm 12,4$ nmol CDNB min^{-1} mgPt $^{-1}$) (Figura 35C e D).

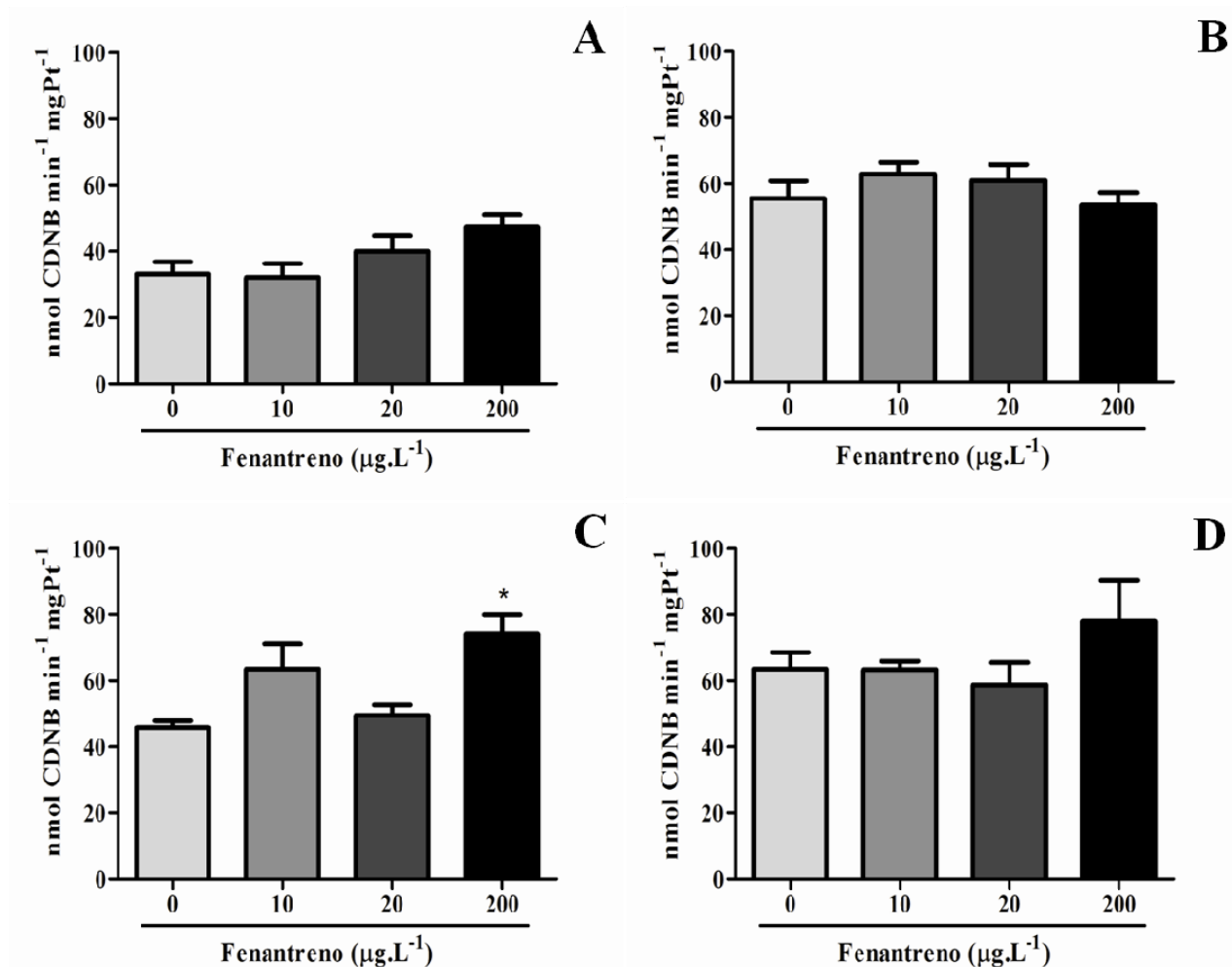


Figura 35. Atividade da glutatona s- transferase (nmol CDNB min⁻¹ mgPt⁻¹) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Atividade da glutatona s-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mgPt⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Atividade da glutatona s-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mgPt⁻¹) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Atividade da glutatona s-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mgPt⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Atividade da glutatona s-transferase (nmol CDNB min⁻¹ mgPt⁻¹) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle (p < 0,05).

4.2.5.4 Peroxidação lipídica - LPO

As concentrações de hidroperóxido de cumeno (CHP) na peroxidação lipídica (LPO) em brânquias de *P.lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas não diferiram significativamente com relação ao controle no mesmo período (C= 209,1 ± 56,6 μmol CHP mgPt⁻¹; E₁= 200,8 ± 9,51 μmol CHP mgPt⁻¹; E₂= 204,9 ± 36,3 μmol CHP mgPt⁻¹; E₃= 217,5 ± 26,5 μmol CHP mgPt⁻¹). Já no período de exposição de 96 horas houve um aumento significativo nas concentrações de hidroperóxido de cumeno nas brânquias dos animais expostos a 200μg.L⁻¹ de fenantreno (C= 181,7 ± 31,78 μmol CHP mgPt⁻¹; E₁= 185,8 ± 36,69 μmol CHP mgPt⁻¹; E₂= 279,4 ± 38,91 μmol CHP mgPt⁻¹; E₃= 316,1 ± 30,49 μmol CHP mgPt⁻¹) (Figura 36A e B).

Nos rins dos animais expostos ao fenantreno, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações de hidroperóxido de cumeno nos dois períodos de exposição (24 e 96 horas), com relação ao controle no mesmo período (24h: C= 272,4 ± 74,2 μmol CHP mgPt⁻¹; E₁= 275,9 ± 24,91 μmol CHP mgPt⁻¹; E₂= 270,8 ± 20,44 μmol CHP mgPt⁻¹; E₃= 273,7 ± 24,27 μmol CHP mgPt⁻¹, 96h: C= 252,4 ± 28,92 μmol CHP mgPt⁻¹; E₁= 248,8 ± 43,78 μmol CHP mgPt⁻¹; E₂= 249,5 ± 26,6 μmol CHP mgPt⁻¹; E₃= 331 ± 46,52 μmol CHP mgPt⁻¹) (Figura 36C e D).

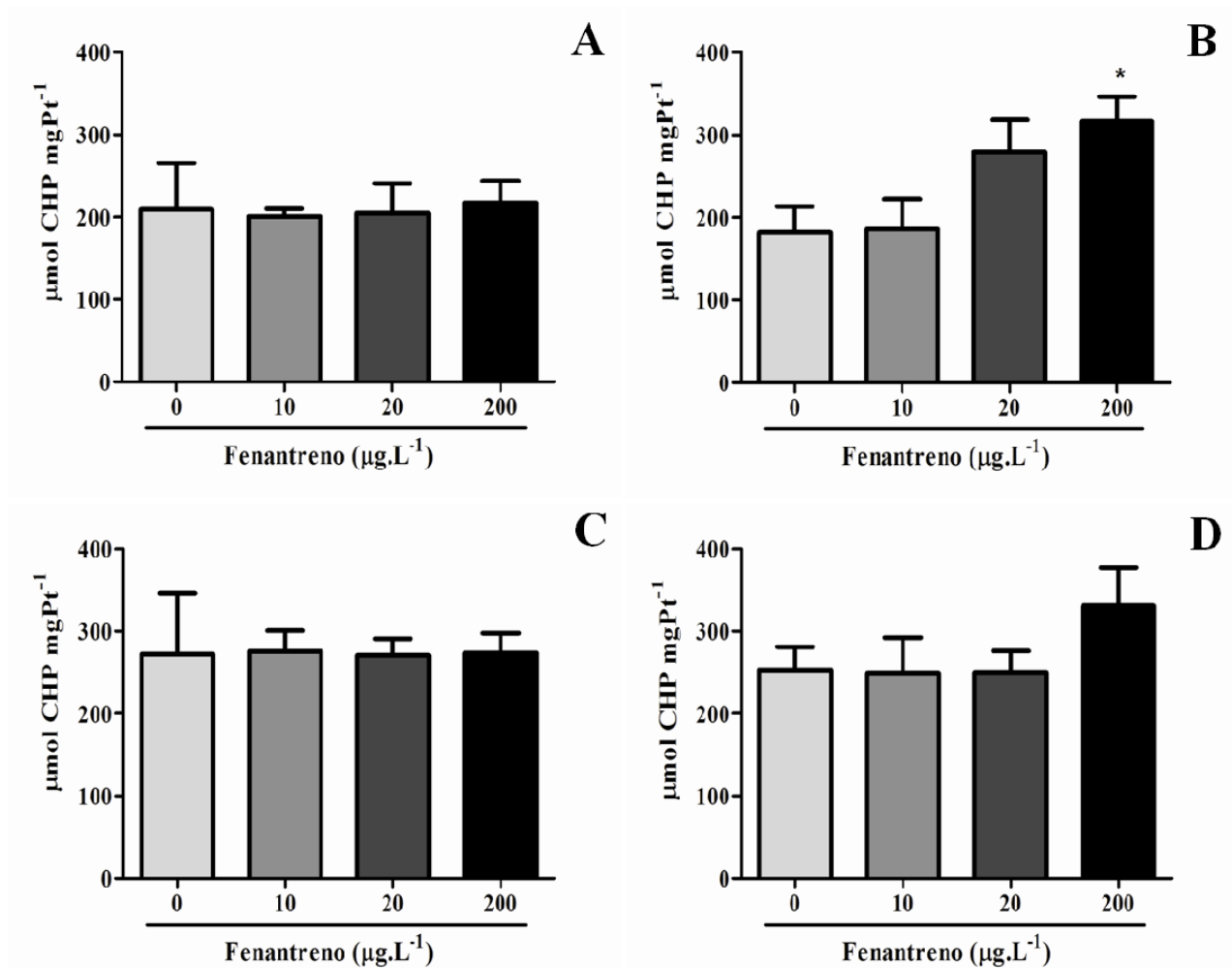


Figura 36. Concentrações de hidroperóxido de cumeno ($\mu\text{mol CHP.mgPt}^{-1}$) em brânquias e rins de *Prochilodus lineatus*. **(A)** Concentrações de hidroperóxido de cumeno ($\mu\text{mol CHP.mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(B)** Concentrações de hidroperóxido de cumeno ($\mu\text{mol CHP.mgPt}^{-1}$) em brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. **(C)** Concentrações de hidroperóxido de cumeno ($\mu\text{mol CHP.mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 24 horas. **(D)** Concentrações de hidroperóxido de cumeno ($\mu\text{mol CHP.mgPt}^{-1}$) em rins de *Prochilodus lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas. *indica diferenças significativas com relação ao grupo controle ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Concentração letal 50% fenantreno em *P. lineatus*

A determinação da concentração letal 50% fornece informações rápidas e importantes sobre a toxicidade de certo composto para uma determinada espécie e indica assim possíveis concentrações subletais (GOLDSTEIN, 1983).

Segundo a classificação de Zucker (1985), quanto à toxicidade aguda para organismos aquáticos, o fenantreno pode ser considerado moderadamente tóxico para o curimatá (*P. lineatus*), uma vez que a concentração letal 50% determinada foi entre 1 e 10 mg.L⁻¹ (CL_{50-96h} = 1,013 mg.L⁻¹). Os dados encontrados são similares aos encontrados por Veintemilla (2006) que estimou a CL_{50;96 h} do fenantreno para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) em 0,94 mg.L⁻¹, com limite inferior e superior de 0,91mg.L⁻¹ e 0,97mg.L⁻¹, respectivamente.

Comparando os valores encontrados da CL_{50;96h} para *P. lineatus* expostos ao fenantreno, com os valores de CL_{50;96h} do herbicida Roundup, pode-se constatar que o fenantreno é mais tóxico para a espécie, uma vez que a CL_{50;96h} do Roundup para *P. lineatus* foi estimada em 13,69 mg.L⁻¹ (LANGIANO e MARTINEZ, 2008), classificando-o como ligeiramente tóxico de acordo com a classificação de toxicidade de Zucker (1985). Entretanto, o cobre é altamente tóxico para essa espécie. Os valores de CL_{50;96h} para o cobre determinados por Mazon e Fernandes (1999) e Takasusuky et al. (2004) foram 29 ± 3 µg Cu.L⁻¹ (pH 7,0), 200 ± 30 µg Cu.L⁻¹ (pH 4,5) e 15 ± 3 µg Cu.L⁻¹ (pH 8,0) a 25 °C respectivamente, e por Carvalho e Fernandes (2006) foram 98 ± 10 µg Cu.L⁻¹ (pH 4,5) e 16 ± 2 µg Cu.L⁻¹ (pH 8,0) a 20 °C e 88 ± 5 µg Cu.L⁻¹ (pH 4,5) e 14 ± 5 µg Cu.L⁻¹ (pH 8,0) a 30 °C.

Assim, o *P. lineatus* possui sensibilidade distinta aos diferentes tipos de substâncias e esta sensibilidade ainda pode variar de acordo com características físicas e químicas da água, como pH, alcalinidade, dureza e temperatura, como já constatado nos estudos citados anteriormente com *P. lineatus* expostos ao cobre em diferentes condições de pH e temperatura (MAZON E FERNANDES, 1999; TAKASUSUKY et al., 2004; CARVALHO E FERNANDES, 2006). Considerando então as diferenças de sensibilidade desta espécie a um mesmo composto em diferentes condições da água, a mudança constante das características químicas e físicas da água em um ambiente aquático, e a falta de informação sobre a toxicidade do fenantreno para *P. lineatus* nestas diferentes condições da água, mais estudos são necessários para se obter uma resposta concreta sobre o impacto do fenantreno nos ecossistemas aquáticos. Neste estudo foi determinada a toxicidade do fenantreno para *P. lineatus* em águas com as seguintes características físicas e

químicas: oxigênio dissolvido: 7.0-7.5 mg L⁻¹, pH: 6,9-7,4, condutividade: 124-130 μS cm⁻¹, alcalinidade: 35-43 mg L⁻¹ CaCO₃, dureza total: 39-50 mg L⁻¹ CaCO₃, e temperatura: 24 ± 2°C.

5.2 Respostas genotóxicas, fisiológicas, bioquímicas e morfológicas de *P. lineatus* após exposição subletal

Considerando que danos ao DNA são considerados os principais eventos causados por agentes genotóxicos, que levam às mudanças hereditárias e ao desenvolvimento de doenças, nos últimos anos, muitos ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar a genotoxicidade de poluentes lançados no ambiente, como metais pesados e contaminantes orgânicos (VARGAS et al., 2001; REIS FERREIRA e NEPOMUCENO, 2008). No presente estudo, apesar de não ter ocorrido diferenças significativas de aberrações nucleares nos eritrócitos dos animais expostos ao fenantreno e a porcentagem de micronúcleos ter sido muito baixa, o aumento na porcentagem de micronúcleos nos animais expostos a maior concentração de fenantreno sugere nessa concentração ou mais alta o fenantreno pode ter um efeito mutagênico, assim como descrito por Pretti et al. (2007), que relatou um aumento significativo desta variável em *P. lineatus* expostos a fração solúvel da gasolina.

As variáveis sanguíneas podem fornecer informações importantes sobre a saúde de um animal (KAVAMOTO et al., 1983), uma vez que as células do sangue são as primeiras células a entrar em contato com xenobióticos e também podem mudar em resposta a alterações bioquímicas ou fisiológicas causadas pela exposição a xenobióticos (CERQUEIRA e FERNANDES, 2002; MAZON et al., 2002; SILVEIRA-COFFIGNY et al., 2004; RUAS et al., 2008). As alterações hematológicas são importantes porque reflete qualquer mudança no ambiente externo e interno, desta forma estes parâmetros podem ser bom indicador da saúde de animais aquáticos expostos a contaminantes (DAVISON et al., 1993). Alterações nos parâmetros hematológicos já foram relatadas em peixes expostos a diferentes tipos de petróleo e derivados (ALKINDI et al., 1996; DAVISON et al., 1992; SIMONATO, 2010).

Os eritrócitos são essenciais para o transporte de gases respiratórios entre as brânquias e os tecidos; os leucócitos possuem uma alta atividade fagocitária e participam ativamente da defesa do animal contra organismos estranhos, sendo essenciais para as respostas imunológicas (SERPUNIN e LIKHATCHYOVA, 1998; TAVARES-DIAS e MORAES, 2004) e os trombócitos estão envolvidos na coagulação sanguínea e também na defesa do organismo em peixes (PASSANTINO et al., 2005).

Nos animais expostos ao fenantreno por 24 horas, a diminuição dos valores de Hct e VCM, sem mudanças no RBC, e o aumento na variável CHCM sugerem que houve um deslocamento de

água dos eritrócitos, o qual pode reduzir a capacidade do sangue de transportar oxigênio das brânquias para o tecido. Já em *P. lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas, as variáveis hematológicas foram revertidas e houve um aumento do HCM, VCM e da concentração de Hb em relação ao grupo controle, que sugerem uma resposta dos animais para aumentar o transporte de oxigênio das brânquias para o tecido e evitar a hipóxia tecidual.

De acordo com Cerqueira e Fernandes (2002), as alterações morfológicas de defesa nas brânquias como proliferação celular, edema e aumento da secreção mucosa causadas pelos xenobióticos de forma a evitar que os xenobióticos alcancem a corrente sanguínea, podem causar disfunção respiratória devido ao aumento da distância de difusão água-sangue, o que reduz a captação de O₂ pelas brânquias e explica o padrão observado nas variáveis hematológicas dos animais expostos ao fenantreno por 96 horas. Além disso, segundo Duarte et al. (2010), os hidrocarbonetos presentes no petróleo promovem graves distúrbios no transporte do oxigênio uma vez que esses hidrocarbonetos são conhecidos por alterar a permeabilidade dos eritrócitos com um forte efeito hemolítico.

Segundo Benfey e Berowne (2000), *Oncorhynchus mykiss* e *Salvelinus fontinalis* submetidos ao estresse, mediado por cortisol, apresentaram uma diminuição no número de leucócitos e um leve aumento no número total de trombócitos, padrão também observado em *P. lineatus* expostos ao fenantreno por 96 horas, neste estudo. Estes autores mencionam a hipótese de que esta diminuição dos leucócitos ocorre porque o estresse leva a uma redistribuição dos linfócitos, principalmente nos órgãos linfóides, ou leva a destruição dos mesmos em resposta ao alto nível de cortisol, diminuindo desta forma também o número de linfócitos na corrente sanguínea. Porém, no presente trabalho houve um aumento no número de linfócitos no sangue dos animais expostos ao fenantreno por 96 horas. Neste caso, este aumento sugere que, em *P. lineatus*, houve provavelmente uma redistribuição de outros leucócitos como, por exemplo, monócitos e neutrófilos, que diminuíram significativamente no sangue destes animais.

Assim, o aumento no número de linfócitos nestes animais pode ter ocorrido com uma resposta a processos inflamatórios provocados pelo contaminante, uma vez que estas células são responsáveis pela resposta imune específica humoral e celular, promovendo a produção de anticorpos e o aumento da capacidade citotóxica, atuando no processo de memória imunológica e promovendo a liberação de fatores de regulação da função imune (YOSHINAGA et al., 1994).

Distúrbios nas concentrações plasmáticas de íons e/ou da osmolalidade foram relatados em várias espécies de peixes expostas a concentrações elevadas de hidrocarbonetos do petróleo (ENGELHARDT et al., 1981) e sabe-se também que proteínas transportadoras e enzimas como a Na⁺/K⁺ATPase (NKA) e a anidrase carbônica (AC), principalmente em brânquias e rins, são

freqüentemente afetados pela presença destes compostos (KENNEDY e FARRELL, 2005; SOUZA, 2007).

Considerando que são principalmente nas células-cloreto (CC) de brânquias e rins que estão localizadas as enzimas NKA e AC, estas células desempenham um papel essencial na manutenção de um ambiente interno ionicamente equilibrado absorvendo e eliminando Na^+ e Cl^- (BINDON et al., 1994). Sendo assim, a osmolalidade plasmática, as concentrações individuais dos íons, complementados pelos resultados de quantidade de CC e das atividades da NKA e anidrase carbônica em brânquias e rins, constituem parâmetros importantes para indicação de efeitos subletais de poluente em peixes (SIMONATO, 2010).

No presente estudo, a exposição ao fenantreno ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) causou redução nos íons Na^+ transitória após 24 h de exposição, seguida de um aumento nas concentrações desse íon após 96 h de exposição, e conseqüentemente, na osmolalidade plasmática, sugerindo assim uma tendência a um desequilíbrio iônico, uma vez que não foram encontradas alterações significativas no Cl^- em nenhuma das concentrações e períodos expostos. Alterações não significativas na concentração de Cl^- também foram descritas por Davison et al. (1993) após a exposição de *Pagothenia borchgrevinki* à fração solúvel do diesel (FSD), durante 7 dias. Os processos que tendem a aumentar ou a diminuir a concentração dos íons Na^+ tendem respectivamente a aumentar e diminuir os íons Cl^- e há desequilíbrio eletrolítico quando isso não ocorre (SAKURAGUI, 2003).

Vários estudos relacionam o aumento ou a diminuição do Na^+ e Cl^- com o aumento ou diminuição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (LAURENT e HEBIBI, 1989; BURY et al., 1998; PAULINO, 2011). Nas brânquias, esta relação foi evidente no presente estudo uma vez que ocorreu uma diminuição da atividade da NKA branquial nos animais expostos a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno após 24 h de exposição e um aumento nos animais expostos a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno durante 96 h, assim como a concentração do íon Na^+ no plasma destes animais. Nos rins, esta relação foi um pouco menos evidente, pois somente os animais expostos a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 h tiveram um aumento significativo da atividade da NKA renal. Esses resultados sugerem a existência de uma via de inibição/estimulação das vias de absorção de sódio, conforme demonstrado pela inibição/estimulação da NKA, o que resultou em uma diminuição/aumento na concentração de Na^+ plasmático em 24 e 96 horas, respectivamente. SIMONATO (2010) também observou esta correlação entre a atividade da Na^+/K^+ -ATPase e a concentração do íon Na^+ em *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina por 24 e 96 horas.

A atividade da AC branquial diminuiu significativamente em todas as concentrações de fenantreno nos animais expostos por 96 horas, o que implica na diminuição da capacidade osmorregulatória e do balanço ácido-base, podendo causar assim acidose respiratória

(ARASHISAR et al., 2004). Estes dados corroboram resultados já encontrados em outros trabalhos com *Atherinella brasiliensis* (SOUZA, 2007), trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (ARASHISAR et al., 2004) e enguias (*Anguilla anguilla*) (LIONETTO et al., 1998), que relataram diminuição da atividade da AC branquial nos animais expostos a um contaminante, mesmo com aumento da atividade da enzima NKA nestes animais, e respectivo aumento da assimilação do Na^+ , sugerindo assim que a AC nas brânquias de *P. lineatus*, está mais relacionada ao balanço ácido-base, do que com a regulação osmo-iônica.

Apesar da existência de dados na literatura sobre a inibição da AC em brânquias (LIONETTO et al., 1998; VITALE et al., 1999; ARASHISAR et al., 2004) e intestino (LIONETTO et al., 1998) em organismos aquáticos expostos a contaminantes químicos, existem poucos estudos sobre a resposta renal a estes compostos. Neste trabalho, a AC renal exibiu menor sensibilidade ao fenantreno do que a AC branquial, sendo que sua atividade foi aparentemente ativada somente nos peixes expostos a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 horas. Esta ativação provavelmente está relacionada à compensação dos distúrbios íon e osmorregulatórios, uma vez que nestes animais ocorreu um aumento da assimilação do íon Na^+ e da osmolalidade, o que demandou um aumento no fornecimento de prótons para a troca Na^+/H^+ via aumento na atividade da anidrase carbônica renal.

Nos animais expostos ao fenantreno ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) por 24 horas, o número de células-cloreto. mm^{-2} observado por imunomarcagem dessas células nas brânquias não diferiram significativamente do grupo controle. Entretanto, foi observado, através de análise em MEV, diminuição da densidade destas células nas brânquias dos animais expostos a maior concentração de fenantreno ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$), corroborando assim com a hipótese da existência de uma via de inibição da absorção de íons Na^+ nestes animais, que resultou em diminuição na concentração de Na^+ . Apesar da existência desta via de inibição, o aumento encontrado na AFCC destes animais mostra uma resposta celular para restabelecer a homeostase iônica, uma vez que o aumento da AFCC aumenta a superfície de contato do meio com a célula favorecendo a absorção de íons (LAURENT e HEBIBI, 1989; GRECO, 1995; PAULINO, 2011).

Além disso, apesar dos resultados apresentados refletirem uma estimulação das vias de tomada de Na^+ o nos animais expostos a $200 \mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 96 h, como demonstrado pela ativação da enzima NKA nas brânquias e rins, que resultou em aumento na concentração do íon Na^+ e da osmolalidade plasmática, esta tendência foi observada somente na análise imunohistoquímica contra Na^+/K^+ -ATPase das células-cloreto renais, que apresentou um aumento no número de células-cloreto. mm^{-2} nos rins, sendo que nas brânquias foi observado uma diminuição no número de células-cloreto. mm^{-2} destes animais e também daqueles expostos a $20 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Esta diminuição no número de células-cloreto/mm² e também na AFCC nas brânquias destes animais, apesar do aumento na atividade da NKA, podem ter ocorrido pois, segundo Wendelaar Bonga (1997) a exposição a agentes estressores pode promover apoptose das células-cloreto, e esta apoptose não necessariamente diminuirá também a atividade da NKA, uma vez que as células restantes devem compensar a ausência das outras, podendo desta forma ocorrer um aumento na atividade da NKA, como observado neste estudo. De acordo com Bury et al. (1998), o cortisol induz a apoptose das células-cloreto e alterações no epitélio branquial podem ser parte de uma resposta integrada de estresse.

Lesões no tecido branquial e renal podem indicar ação tóxica de poluentes e serem utilizadas como bioindicadoras para o monitoramento ambiental, além de contribuir para as alterações na função desses órgãos (OVERSTREET, 1988; SCHWAIGER et al., 1997, FERNANDES e MAZON, 2003).

Em peixes, o epitélio branquial tem papel importante central na homeostase iônica e osmótica (RANDALL et al., 1999). Em situações de estresse osmótico podem ocorrer algumas alterações morfo-fisiológicas no epitélio branquial incluindo a síntese ou destruição de componentes moleculares do sistema de transporte, variações na morfologia, no número de células-cloreto e histopatologias (RANDALL et al., 1999). Alguns poluentes têm efeito direto sobre o tecido branquial, porém a maioria das lesões aparece como resultado de mecanismos de defesa ou mecanismos compensatórios, que podem ser locais ou mediados pelo eixo hipotálamo-hipófise-células interrenais e pelo sistema nervoso autônomo (WENDELAAR BONGA, 1997).

Hipertrofia e hiperplasia do epitélio lamelar, congestão vascular e constrição do sistema de células pilares foram observadas com frequência no epitélio branquial de *P. lineatus* expostos a 200 µg.L⁻¹ de fenantreno por 96 h, o que resultou em aumento do VMA e do IAH encontrados nas brânquias. Hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais lamelar e proliferação de células mucosas são exemplos de mecanismos de defesas contra o agente tóxico, impedindo que o agente entre no organismo. Entretanto, como já citado, esses mecanismos aumentam a distância água-sangue, podendo dificultar a efetividade das trocas gasosas (MALLAT, 1985; POLEKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994; FERNANDES e MAZON, 2003), e, indiretamente, contribuir para as alterações observadas na regulação osmo-iônica e nas variáveis hematológicas dos animais expostos ao fenantreno.

Outro mecanismo de defesa encontrado nos animais expostos ao fenantreno com frequência foi a hiperplasia celular no filamento. Essa proliferação tende diminuir os espaços interlamelares, reduzindo o contato do epitélio branquial com o agente estressor. Em condições mais severas, a hiperplasia pode levar à fusão parcial ou total da lamela, pontualmente ou de uma forma geral,

reduzindo a superfície respiratória, devido ao desaparecimento das lamelas (RAJBANSHI e GUPTA, 1988). Neste estudo, embora pouco freqüente, a fusão lamelar foi encontrada nas brânquias de *P. lineatus* expostos a todas as concentrações de fenantreno por 96 h. Khan (2003), estudando linguados (*Pleuronectes americanus*) coletados em local contaminado com PAHs, também encontrou nas brânquias alterações como hiperplasia e hipertrofia do epitélio lamelar resultando em fusão lamelar e aumento de células mucosas resultando em um aumento na produção de muco.

Além destas alterações histopatológicas que protegem o organismo da entrada dos xenobióticos, foi observado também, nos animais expostos a maior concentração de fenantreno nos dois períodos, lesões vasculares como o aneurisma, que é o resultado do rompimento ligações intercelulares entre as células pilares e é um efeito deletério do xenobiótico sobre o tecido branquial (MARTINEZ et al., 2004).

Deste modo, embora os valores de IAH e VMA nos animais expostos a maior concentração de fenantreno por 96 horas, tenham indicado a ocorrência de danos de leve a moderados nas brânquias e lesões pontualmente localizadas nestes órgãos, a análise conjunta das histopatologias com outras variáveis osmo-iônicas e hematológicas mostram que a maioria das histopatologias brânquiais observadas podem ter contribuído para as alterações observadas no equilíbrio osmótico e no transporte de oxigênio no sangue.

Os rins constituem a principal rota de excreção para os metabólitos de vários xenobióticos aos quais os peixes tenham sido eventualmente expostos (HINTON et al., 1992). Por também receber grande fluxo sanguíneo, o rim pode ser considerado, como as brânquias, órgão alvo para os poluentes (HINTON et al., 1992; EVANS, 1993; SILVA, 2004).

A maioria e mais severas alterações encontradas no tecido renal, como hipertrofia celular, degeneração granular, oclusão da luz tubular, dilatação dos capilares, aumento do volume glomerular, redução do espaço de Bowman e necrose, foram mais freqüentes nos animais expostos a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de fenantreno por 24 e 96 h. Deste modo, o IAH nos rins destes animais, apesar de não apresentar aumento significativo com relação ao controle, indicou alterações severas no órgão e o VMA apresentou aumento significativo com relação ao controle.

Comparando os valores de VMA e IAH dos rins com os das brânquias, pode-se constatar que o tecido renal foi mais sensível ao contaminante, com alterações mais severas e mais distribuídas, talvez pelo fato do rim possivelmente concentrar maior quantidade de contaminantes devido ao intenso fluxo sanguíneo.

Alterações similares às encontradas no tecido renal foram descritas para *P. lineatus* expostos a concentrações subletais de triclorfon (VEIGA et al., 2002), e para *Salmo trutta* e *Barbatula*

barbatula expostos a água de dois ribeirões contaminados com pesticidas, PCB, PAH e metais (GERNHOFER et al., 2001; SCHWAIGER, 2001; SILVA, 2004).

As degenerações tubulares, granular e hialina, têm sido descritas para o rim de peixes expostos a vários contaminantes (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995) e, como ocorre nas brânquias, não se trata de respostas a um agente estressor específico (CAMARGO, 2004). Alterações no corpúsculo renal podem prejudicar a formação do filtrado que ocorre nos glomérulos (MEYER e HENDRICKS, 1985; HINTON e LAURÉN, 1990). Assim, a dilatação dos capilares do glomérulo, devido ao aumento do fluxo sanguíneo, e o espessamento do endotélio capilar glomerular, pela proliferação anormal de células, podem levar à redução do espaço de Bowman, sendo que esta redução foi uma das alterações mais freqüentes nos animais expostos ao fenantreno neste estudo. Nos estudos citados com *P. lineatus* (VEIGA et al., 2002) e com *Salmo trutta* e *Barbatula barbaluta* (GERNHOFER et al., 2001; SCHWAIGER, 2001) essa alteração também foi observada.

Além disso, a oclusão da luz tubular, uma alteração de estágio II que foi freqüente nos animais expostos ao fenantreno, pode ocorrer por causa de um acúmulo de material no lúmen dos túbulos proximais ou distais ou através de um aumento no volume das células endoteliais que pode resultar na redução do lúmen, e conseqüente estreitamento da luz tubular (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). Estes tipos de alterações podem prejudicar a passagem do filtrado, além de comprometer o processo de reabsorção e secreção tubular (MEYERS e HENDRICKS, 1985; SANTOS, 2005).

Após um dano renal induzido por agentes tóxicos, pode haver a produção de néfrons inteiramente novos (REIMSCHUESSEL, 2001; TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). A presença de novos néfrons em peixes pode indicar que o comprometimento fisiológico destes não está impedindo a regeneração tecidual (TAKASHIMA e HIBIYA, 1995). Neste estudo, apesar de pouco freqüentes, novos néfrons foram observados nos animais expostos a maior concentração de fenantreno nos dois períodos. Sendo assim, apesar das lesões observadas nos órgãos destes animais se apresentarem severas, o organismo destes animais já apresentaram uma tentativa inicial de evitar danos maiores no funcionamento do rim através da produção de novos néfrons (SILVA, 2004).

Novos néfrons também foram observados em *Carassius auratus* exposto ao hexaclorobutadieno, gentamicina e cloreto de mercúrio e também em *Oncorhynchus mykiss* exposto ao tetracloroetileno (REIMSCHUESSEL, 2001; SILVA, 2004).

Como já citado anteriormente, a biotransformação de xenobióticos é um mecanismo essencial para a eliminação de compostos tóxicos, porém é uma importante fonte de ERO (STEGEMAN et al., 1992; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005), as quais podem ser eliminadas pelos organismos aeróbicos através de diferentes mecanismos, enzimáticos e não-enzimáticos, bem

como reparar e/ou prevenir os danos causados por elas (STOREY, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005). Além do órgão mais comumente relacionado à biotransformação de xenobióticos, o fígado, alguns autores também destacam a importância de outros órgãos detoxificantes, como os rins e as brânquias (JONSSON et al., 2002; SIMONATO, 2010).

Considerando que a SOD é uma enzima que catalisa a reação espontânea de dismutação do radical superóxido (O_2^-), com a produção final de H_2O_2 e O_2 , e a CAT catalisa a redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , o sistema SOD-CAT pode fornecer uma importante linha de defesa contra as ERO (PANDEY et al., 2003). No presente estudo, as atividades da SOD e CAT nas brânquias dos animais expostos a maior concentração de fenantreno ($200 \mu g.L^{-1}$) por 96h apresentaram uma diminuição significativa com relação ao controle, apresentando desta forma uma correlação já esperada entre as duas enzimas, uma vez que a diminuição da H_2O_2 gerada pela SOD na transformação do ânion superóxido, provocou uma diminuição do peróxido de hidrogênio disponível na célula.

Nos rins dos animais expostos a maior concentração de fenantreno ($200 \mu g.L^{-1}$) por 96h, a SOD apresentou diminuição na sua atividade e a CAT, aumento significativo. Desta forma, o possível aumento no H_2O_2 indicado pela elevação da CAT neste órgão, não reflete um efeito da SOD e sim provavelmente, um efeito específico do fenantreno na produção de ERO neste órgão.

A diminuição da atividade da SOD nos dois órgãos pode ter sido provocado pelo fenantreno pois é conhecido que derivados de petróleo podem causar modificações estruturais em enzimas das defesas antioxidantes, inativando-as (CHE et al., 2007) e resultando assim em estresse oxidativo. Além disso, a SOD apresenta sensibilidade ao H_2O_2 , podendo ser inativada na presença desse composto (SAMPSON e BECKMAN, 2001), e ainda existe várias condições patológicas provocadas por ERO que causam diminuição na SOD (HERMES-LIMA, 2004; SIMONATO, 2010).

A GPx, outra enzima do sistema de defesa antioxidante, que é responsável por catalisar a redução do H_2O_2 em água, utilizando a GSH como co-fator, é muito importante também para evitar a formação de lipoperóxidos, uma vez que também degrada hidroperóxidos orgânicos (VAN DER OOST et al., 2003, HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005). Como resultado do aumento da produção de hidroperóxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio, pode-se esperar um aumento na atividade da GPx após exposição dos peixes ao fenantreno, entretanto, neste estudo, as alterações da atividade da GPx não foram significativas nas brânquias e rins em nenhum dos grupos expostos ao fenantreno. Possivelmente isto ocorreu, ou porque o aumento da produção de hidroperóxidos orgânicos provocados pela exposição ao fenantreno não foi suficiente para aumentar sua atividade, assim como a produção de H_2O_2 , representada pela atividade da SOD, que também não foi

significativa na maioria dos grupos, ou a atividade desta enzima foi ativada em outro órgão de detoxificação, como o fígado por exemplo. Em estudo realizado por SIMONATO (2010), as brânquias de *P. lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina (FSG) também não apresentaram alterações significativas na atividade da GPx, porém o fígado apresentou aumento significativo desta enzima nos peixes expostos à FSG durante 96 horas.

A enzima glutathione S-transferase (GST) como a GPx usa a GSH como co-fator no processo de conjugação de xenobióticos para excreção de uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos (MONTEIRO et al., 2010; PAULINO, 2011). A atividade da GST nas brânquias e rins dos animais expostos ao fenantreno não apresentaram alterações significativas com relação ao controle, houve um aumento significativo desta enzima somente nos rins dos animais expostos a maior concentração de fenantreno ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) por 24 horas. Desta forma, com exceção dos animais deste último grupo citado, ou a exposição ao fenantreno não foi suficiente para provocar uma ativação da GST nos animais, ou a atividade desta enzima foi ativada significativamente em outro órgão de detoxificação, como o fígado. *Prochilodus lineatus* expostos a WSD (mistura de água a óleo diesel comercial) apresentaram variação significativa na atividade hepática de GST quando comparado aos grupos controle, após 96 horas e 15 dias (SIMONATO et al., 2007). Em *Oreochromis mossambicus* expostos a altas concentrações ($6 - 32 \mu\text{g.g}^{-1}$) de fenantreno, alterações significativas na GST ocorreram após 7 dias de exposição (SHAILAJA e D' SILVA, 2003; RIBEIRO, 2007).

A GSH, um tripeptídeo endógeno antioxidante, pode ser considerado um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, participando de muitas reações celulares para neutralizar diretamente os pro-oxidantes ou atuando em reações enzimáticas onde opera como substrato, como já foi referido anteriormente (VAN DER OOST et al., 2003; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005; SIMONATO, 2010). No presente estudo as concentrações de GSH em brânquias e rins dos animais expostos ao fenantreno, não alteraram significativamente em relação aos do grupo controle, o que pode ser justificado pela inalteração das atividades das enzimas GST e GPx que utilizam este tripeptídeo como substrato para as reações de biotransformação e defesa antioxidante, respectivamente (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2005) ou também pela pouca quantidade de pro-oxidantes produzidos pelo fenantreno, disponíveis para neutralização direta da enzima.

Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente ou inativado podem ocorrer danos oxidativos como a peroxidação lipídica, a qual pode alterar a permeabilidade de membranas e causar danos ou até morte celular (HERMES-LIMA, 2004). No presente estudo, o ensaio FOX indicou aumento de peroxidação lipídica somente nas brânquias dos animais expostos a maior

concentração de fenantreno ($200 \mu\text{g.L}^{-1}$) por 96 horas, mostrando desta forma que a inibição nas enzimas CAT e SOD, assim como a não alteração dos mecanismos das GPx, GST e GSH, que sugere falta de atuação destes mecanismos contra as EROs nas brânquias destes animais, levaram ao desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que:

1. Considerando a CL50;96h, o fenantreno pode ser considerado moderadamente tóxico para a espécie *Prochilodus lineatus*;
2. Analisando os efeitos sub-letais do fenantreno para *P. lineatus*, a exposição a 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (CL50/5) fenantreno durante 96 h, causou alterações significativas em quase todos os parâmetros analisados: genotóxicos, fisiológicos, bioquímico e morfológicos.
3. As alterações observadas na osmolalidade e íons plasmáticos indicaram um possível desequilíbrio osmo-iônico provocado pelo fenantreno nestes animais, o qual foi reafirmado através da análise da atividade das enzimas envolvidas na osmorregulação (NKA e AC) em brânquias e rins, que correlacionaram com o padrão de alterações osmo-iônica observadas.
4. O número de células-cloreto em brânquias e rins, variável que também está diretamente ligada a regulação osmo-iônica, apresentou na sua maioria dados que se correlacionavam com as alterações ocorridas nas variáveis osmo-iônicas e quando não se correlacionavam, suas alterações representavam um efeito direto da exposição ao fenantreno, como por exemplo, a indução de apoptose nas células.
5. As alterações nas variáveis hematológicas representaram uma resposta que corresponde a uma tentativa do organismo de aumentar a captação de oxigênio nas brânquias e também melhorar a capacidade de transporte do oxigênio, além de respostas a processos inflamatórios provocados pelo contaminante. Um aumento significativo na porcentagem de micronúcleos em eritrócitos também indicou um possível efeito mutagênico do fenantreno.
6. As histopatologias das brânquias apresentaram-se no geral como mecanismos de defesa. Sabendo-se que esses mecanismos aumentam a distancia água-sangue e podem então dificultar a efetividade das trocas gasosas e iônicas, estas histopatologias podem ter contribuído para as alterações osmo-iônicas e principalmente nas variáveis hematológicas.
7. As histopatologias renais, que se apresentaram na maioria como alterações que podem prejudicar a formação e passagem do filtrado, além de comprometer o processo de reabsorção e secreção tubular, foram mais severas do que as histopatologias encontradas nas brânquias, logo, também podem ter contribuído para as alterações osmo-iônicas nos animais expostos ao fenantreno (200 $\mu\text{g.L}^{-1}$).
8. Quanto as enzimas de estresse oxidativo analisadas, tanto a inibição nas enzimas CAT e SOD, quanto a não alteração dos mecanismos das GPx, GST e GSH nas brânquias destes

animais, levaram a um desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos e a formação de peróxidos lipídicos, os quais podem alterar a permeabilidade de membranas e causar danos ou até morte celular.

Assim, as alterações observadas nos animais expostos a maior concentração de fenantreno (CL50/5) podem provocar efeitos adversos à sua saúde, de modo que, ocorrerá um desvio energético para restaurar as condições normais do organismo 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.

Considerando o aumento contínuo das concentrações de fenantreno nos ambientes aquáticos, a pouca informação disponível sobre sua toxicidade em peixes de água doce, além da inexistência de um limite máximo permitido nos ambientes aquáticos pelos órgãos reguladores do país, os resultados deste trabalho são importantes para o maior entendimento da toxicidade deste composto e seus efeitos sub-letais em uma espécie nativa de importância ecológica e econômica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, P. D. Water pollution. Chichester: Ellis horwood limited, 1989.
- ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15088. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes, 2006. 19p.
- ADAMS, S.M.; SHUGART, L.R.; SOUTHWORTH, G.R.; HINTON, D.E. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. Eds. Biomarkers of Environmental Contamination. Boca Raton: Lewis Publishers, v.19, p. 333- 353, 1990.
- ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Americas Fishers Society, v. 3, p. 104-112, 2002.
- AGRAHARI, S.; GOPAL, K. Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. Pesticide Biochemistry and Physiology, v. 92, p. 57–60, 2008.
- AKAISHI, F. M. et al. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Atyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 46, n. 2, p. 244-253, 2004.
- ALAM, M.; FRANKEL, T. Gill atpase of silver perch, *Bidyanus bidyanus*, and golden perch, *Macquaria ambigua*: effects of environmental salt and ammonia. Aquaculture, 251, 118-113, 2006.
- ALKINDI, A. Y. A.; BROWN, J. A.; WARING, C. P.; COLLINS, J. E. Endocrine, osmoregulatory, respiratory and hematological parameters in flounder exposed to the water soluble fraction of crude oil. Journal of Fish Biology, v. 49, p. 1291-1305, 1996.
- ANTÓN, A.; LIZASO, J. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria, 2001. Disponível em: <www.fundisa.org/articulos/fhaps.pdf>. Acesso em: 15 mai. 2011.
- ANYAKORA, C.; OGBECHE, A.; PALMER, P.; COKER, H. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. Journal of Chromatography, v. 1073, p. 323–330, 2005.
- ARASHISAR, S.; HISAR, O.; YANIK, T.; ARAS, S.M. Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout. Environmental Toxicology and Pharmacology, v. 17, p. 125-128, 2004.
- AZEVEDO, V. C. Efeitos do cobre sobre o estresse oxidativo na anêmona-do-mar *Actinia bermudensis*. Monografia apresentada ao curso de Oceanologia – Universidade Federal do Rio Grande, 2011, 44p.
- BARCAROLLI, I. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of aluminum in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. v. 72, n.3, p. 639 – 646, 2004.
- BARSIENÉ, J. et al. Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil. Aquatic Toxicology, v. 78, n. 1, p. 99-104, 2007.
- BANERJEE, S.; BHATTACHARYA, S. Histopathology of kidney of channa punctatus exposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury, and ammonia. Ecotoxicology and environmental safety, v. 29, p. 265-275, 1994.
- BAUDO, R.; MUNTAU, H. Lesser know in-place pollutants and diffuse source problemas. IN: BAUDO, R.; GIESY, J.P.; MUNTAU, H. (eds.). Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants. Lewis Publishers, INC. Boca Raton, 1990.

- BENFEY, T.J.; BIRON, M. Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, v. 184, p. 167-176, 2000.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences*, v. 65, p. 1865-1874, 1999.
- BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 6, p. 882-890, 1963.
- BEUTLER, E. *Red cell Metabolism: a manual of biochemical methods*. Grune e Stratton, New York, 1975.
- BIANCHINI, A.P.; CARVALHO DE CASTILHO, P. Effect of zinc exposure on oxygen consumption and gill Na⁺, K⁺-atpase of the estuarine crab *Chasmagnathus Granulate*, Dana, 1951 (Decapoda-Grapsidae), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 62, p. 63-69, 1999.
- BIANCHINI, A.; MARTINS, S. E.; JORGE, M. B. O modelo do ligante biológico e suas aplicações em ecotoxicologia, 2009. Disponível em: < www.inct-ta.furg.br/english/difusao/BLMM.pdf>. Acesso em: 28 out. 2011.
- BINDON, S.D.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: implications for gas transfer. *Canadian Journal of Zoology*, v. 72, p. 1395-1412, 1994a.
- BINDON, S.D.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. The effect of branchial chloride cell proliferation on gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, v. 197, p. 47-63, 1994b.
- BRAND, D. G. et al. Salt water-acclimated pink salmon fry (*Oncorhynchus gorbuscha*) develop stress-related visceral lesions after 10-day exposure to sublethal concentrations of water-soluble fraction of North Slope crude oil. *Toxicologic Pathology*, v. 29, n. 5, p. 574-584, 2001.
- BRAUNBECK, T.; BURKHARDT-HOLM, P.; GÖRGE, G.; NAGEL, R.; NEGELE, R.D.; STORCH, V. Regenbogenforelle und zebrabärbling, xwei modelle für verlängerte toxiätstest: relative empfindlichkeit. Art- und organspezifität in der cytopathologischen reaction von leber and darm auf atrazin. *Schr. Reihe Verein Wasser-. Boden-, Lufthygiene.*, v. 89, p. 109-145, 1992.
- BURY, N.R.; LI, J.; LOCK, R.A.; WENDELAAR BONGA, S.E. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. *Aquatic Toxicology*, v. 40, p. 193-202, 1998.
- CAMARGO, M. M. P. Parâmetros morfo-funcionais de *Prochilodus lineatus* submetidos a testes in situ no ribeirão Cambé (Londrina-PR). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós graduação em ciências biológicas – área de concentração zoologia, Universidade Estadual de Londrina, 2004, 92p.
- CARLS, M. G.; RICE, S. D.; HOSE, J. E. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasí*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 18, n. 3, p. 481-493, 1999.
- CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*, v. 251, p.109– 117, 2006.
- CAVRET, S.; FEIDT, C. Intestinal metabolism of PAH: in vitro demonstration and study of its impact on PAH transfer through the intestinal epithelium. *Environmental Research*, v.98, p. 22-32, 2005.
- CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; PARMA, M.J.; SCARABOTTI, P.A.; WUNDERLIN, D.A. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water

- quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environmental Pollution*, v. 157, p. 3025–3033, 2009.
- CERQUEIRA, C.C.C., FERNANDES, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish, *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 52, p. 83-91, 2002.
- CHE, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; WU, M.; LIANG, Y.; LIU, F.; LI, N. Compositions and oxidative damage of condensate, particulate, and semivolatile organic compounds from gasoline exhausts. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 24, p. 11-18, 2007.
- CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H.G. (eds.) *Bioindicators and Biomonitors*. Elsevier, p. 639-671, 2003.
- CIMBARO, J. Bigfish and Blog. Disponível em: <<http://www.thisisbigfish.com/strategy/first-post/>>. Acesso em: 25 out. 2011.
- COLLIER, T. K. et al. A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an urban waterway. *Marine Environmental Research*, v. 46, n. 1/5, p. 243-247, 1998.
- CUMINGS, B. Na Pump. Publishing by. Pearson Education, Inc. Department of Biology. University of Miami. Florida. Disponível em: <<http://www.bio.miami.edu/~cmallery/150/memb/c8x15NaK-pump.jpg>>. Acesso em 12/03/2012.
- DAVISON, W.; FRANKLIN, C.E.; MCKENZIE, J.C.; DOUGAN, M.C.R. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v. 102, p. 185-188, 1992.
- DAVISON, W., FRANKLIN, G.E., MCKENZIE, J. C., CAREY, P. W. The effects of chronic exposure to the water soluble fraction of fuel oil on an antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v. 104, p. 67-70, 1993.
- DIGIULIO, R.T.; BENSON, W.H.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G.M. Ed. *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. 2nd ed. Washington: Taylor e Francis, c.11, p. 345-370, 1995.
- DRABKIN, D. L. The standardization of hemoglobin measurement. *American Journal of Medical Sciences*, v. 215, n. 1, p. 110-111, 1948.
- DUARTE, R. M.; HONDA, R. T.; VAL, A.L. Acute effects of chemically dispersed crude oil on gill ion regulation, plasma ion levels and hematological parameters in tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Aquatic Toxicology*, v. 97, p. 134-141, 2010.
- ENGELHARDT, F.R.; WONG, M.P.; DUEY, M.E. Hydromineral balance and gill morphology in rainbow trout *Salmo gairdneri*, acclimated to fresh and sea water as affected by petroleum exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 1, p. 175-186, 1981.
- EVANS, D.H. *The physiology of fish*. 2 ed. CRC Press, FL, BocaRaton, 1993, 592 p.
- EVANS, D.H.; PIERMARINI, M.; CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiology Review*, v. 85, p. 97-177, 2005.
- FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). *Fish adaptations*. Enfield, Science Publishers, c. 9, p. 203 – 231, 2003.
- FOSSI, M. C. et al. Use of nondestructive biomarkers and residue analysis to assess the health status of endangered species of pinnipeds in the South West Atlantic. *Marine Pollution Bulletin*, v. 34, n. 3, p. 157-162, 1997.
- FRACÁCIO, R. Estudos limnológicos (laboratoriais e in situ), com ênfase na avaliação de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (*Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) – Sub-bacia do rio

- Monjolinho. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em ecologia e recursos naturais – Universidade Federal de São Carlos, 2006, 209p.
- FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Annual Review of Biochemistry*, v. 64, p. 97-112, 1989.
- GAETANI, G.F. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, v. 73, p. 334-339, 1989.
- GERNHOFER, M.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MULLER, E.; TRIEBSKORN, R. Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 8, p. 241 – 260, 2001.
- GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P.G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 8, p. 722-728, 2007.
- GOKSOYR, A.; BEYER, J.; EGAAS, E.; GROSVIK, B.E.; HYLLAND, K.; SANDVIK, M.; SKAARE, J.U. Biomarker responses in Flounder (*Platichthys flesus*) and their use in pollution monitoring. *Marine Pollution Bulletin*, v. 33, p. 36-45, 1996.
- GOLDSTEIN, E. G.; ZAGATTO, P. A.; ARAUJO, R. P. A.; BERTOLETTI, E. Avaliação da toxicidade dos principais despejos industriais da região de ERQ – Suzano. *Travis de ensaios biológicos. Revista Dae*, v. 132, p. 42-47, 1983.
- GRECO, A.M.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F. The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, v. 198, p. 2557-2567, 1995.
- GROMAN, D. B. Histology of the striped bass. Bethesda, American Fisheries Society, 1982, 116p.
- GROSELL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v. 133, p. 287-303, 2002.
- GUNDERSEN, D. T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S. D. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl and chlordane contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 19 n.9, p. 2275-2285, 2000.
- GUTIERREZ, L. L. P. Avaliação do estresse oxidativo sistêmico e órgão-específico na intoxicação crônica por cloreto de mercúrio. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências biológicas: fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002, 90p.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radical in biology and medicine, 3 ed. Clarendon Press, Oxford, 2005, 936p.
- HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, V. Trimed Sperm-Karber method for estimating medial lethal concentrations in toxicology bioassays. *Environmental Science Technology*, 1977, v. 7, p.714-719.
- HEATH, A. G. Water pollution and fish physiology. Boca Raton: C.R.C. Press, 1987.
- HEDDLE, J.A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. *Mutation Research*, v. 123, p. 61-118, 1983.
- HELLOU, J.; WARREN, W. Polycyclic aromatic compounds and saturated hydrocarbons in tissues of flatfish: insight on environmental exposure. *Marine Environmental Research*, v.43, p.11–25, 1997.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical. In: Storey, K, B. Ed. *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley e Sons, p. 319 – 368, 2004.
- HINTON, D.E.; LAUREN, D.J. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. In: McCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Eds.).

- Biological Markers of Environmental Contamination. Boca Raton: CRC Press, p. 17-57, 1990.
- HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELANO, R.A.; OKIHIRO, M.S. Histopathologic biomarkers. In: Hugget, R.; Kimerle, R.; Mehrle, P.; Bergman, H. (Eds.). Biomarkers – biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers, p.155-195, 1992.
- HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. *Comparative Biochemical Physiology B*, v.136, p. 593–620, 2003.
- HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology*, v. 25, p. 563–575, 1973.
- HORISBERGER, J.D. Recent insights into the structure and mechanisms of the sodium pump. *Physiology*, v. 19, p. 377–387, 2004.
- HSU, T.; DENG, F. Studies on the susceptibility of various organs of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to benzo(a)pyreneinduced DNA adduct formation. *Chemosphere*, v. 33, n. 10, p. 1975-1980, 1996.
- HWANG, P.P.; LEE, T.H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 148, p. 479– 497, 2007.
- INCARDONA, J.P.; COLLIER, T.K.; SCHOLZ, N.L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.196, p.191–205, 2004.
- JEE, J.H.; KANG, J.C. Effects of phenanthrene exposure on the acetylcholinesterase activity of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Fisheries Science and Technology*, v.6, p. 225–227, 2003.
- JEE, J.H.; KIM, S.G.; KANG, J.C. Effects of phenanthrene on growth and basic physiological functions of the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 304, p. 123–136, 2004.
- JOBLING, M. Environmental biology of fishes. London: Chapman and Hall, 1995, 455p.
- JONSOON, E. M.; BRANDT, I.; BRUNSTROM, B. Gill filament-based EROD assay for monitoring waterborne dioxin-like pollutants in fish. *Environmental Science and Technology*, v. 36, p. 3340-3344, 2002.
- KAVAMOTO, E. T.; RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TOKUMARU, M. Estudos hematológicos em “bagre” *Rhamdia hilarii* (Val, 1840). Teleósteo no estágio de desenvolvimento gonadal maduro. *Boletim do Instituto de Pesca*. v. 10, p. 53-60, 1983.
- KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 251, p. 6183-6188, 1976.
- KENNEDY, C.J.; FARRELL, A.P. Ion homeostasis and interregional stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasii*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 323, p. 43-56, 2005.
- KHAN, R.A. Influence of petroleum at a refinery terminal on winter flounder, *Pleuronectes americanus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 61, p. 770-777, 1998.
- KHAN, R. A. Health of flatfish from localities in Placentia Bay, Newfoundland, contaminated with petroleum and PCBs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 44, p. 485-492, 2003.
- KNUTZEN, J. Effects on marine organism from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and other constituents of waste water from aluminum smelters with examples from Norway. *Science of the Total Environment*, v. 163, n. 5, p. 107-122, 1995.
- LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos, SP, Ed. Acta, 2004.

- LANDIS, W.G.; YU, M.G. Introduction to environmental toxicology. Boca Raton: Lewis publishers, 1995.
- LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology C, v. 147, p. 222-231, 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.
- LAURENT, P.; HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. Canadian Journal of Zoology, c. 67, p. 3055-3063, 1989.
- LEE, R. F.; PAGE, D. S. Petroleum hydrocarbons and their effects in subtidal regions after major oil spills. Marine Pollution Bulletin, v. 34, n. 11, p. 928-940, 1997.
- LIMA, A.L.C.; EGLINTON, T.I.; REDDY, C.M. High-resolution record of pyrogenic polycyclic aromatic hydrocarbon deposition during the 20th century. Environmental Science Technology, v. 37, p. 53-61, 2003.
- LIONETTO, M.G.; MAFFIA, M.; CAPELLO, M.S.; GIORDANO, M.E.; STORELLI, C.; SCHETTINO, T. Effects of cadmium on carbonic anhydrase and Na⁺ - K⁺ - atpase in ell, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. Comparative Biochemistry and Physiology A, v.120, p. 89-91, 1988.
- LLOYD, R. Pollution and freshwater fish. Oxford, Fishing News Books, 1992.
- LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. Sanidade de organismos aquáticos. São Paulo: Varela, p.263-272, 2004.
- LOWE – MC CONNELL, R. H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. (Tradutores: VAZZOLER, A. E. A. de M.; AGOSTINHO, A. A.; CUNNINGHAM, P. T. M.) São Paulo: Editora USP. 1999.
- MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, v.1, p.63-76, 1999.
- MAHER, P. The effects of stress and aging on glutathione metabolism. Ageing Research Reviews, v. 4, p. 288-314, 2005.
- MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, v. 42, p. 630-648, 1985.
- MANSON, C. F. Biology of freshwater pollution. 3 ed. Londres: Longman, 1996.
- MARTINEZ, C. B. R.; SUADICANI, S. O.; FERRONI, E. N.; MOREIRA, G. S. Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 25, p. 487 - 490, 1992.
- MARTINEZ, C.B.R.; NAGAE, M.Y.; ZAIA, C.T.B.; ZAIA., D.A.M. Morphological and physiological acute effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Brazilian Journal of Biology, v. 64, p. 797-807, 2004.
- MASSUI, D.C.; FURRIEL, R.P.M.; SILVA, E.C.C.; MANTELATTO, F.L.M.; MCNAMARA, J.C.; BARRABIN, H.; SCOFANO, H.M.; FONTES, C.F.L.; LEONE, F.A. Gill microsomal (Na⁺K⁺)-ATPase from the blue crab *Callinectes danae*: Interactions at cationic sites. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, v. 37, p. 2521-2535, 2005.
- MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and Differential Tissue Accumulation of Copper in the Tropical Freshwater Fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 63, p. 797-804, 1999.
- MAZON, A.F.; MONTEIRO, E.A.S.; PINHEIRO, G.H.D.; FERNANDES, M.N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. Brazilian Journal of Biology, v. 62, p. 621-631, 2002.
- MCCORD, J.E.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). Journal of Biological Chemistry, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

- MCKNIGHT, I. M. A hematological study on the mountain whitefish, *Prosopium williamsoni*. Journal of Fisheries Research Board of Canada, v.23, p. 45-64, 1966.
- MEYERS, T.R.; HENDRICKS, J.D. Histopathology. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Eds.). Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, p.283-331, 1985.
- MIDDAUGH, D. P. et al. Preliminary observation on responses of embryonic and larval Pacific herring, *Clupea pallasii*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska North Slope oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v. 34, n. 2, p. 188-196, 1998.
- MONTEIRO, D.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.N. Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). Ecotoxicology, v. 19, p. 105–123, 2010.
- MORON, S.E.; OBA, E.T.; ANDRADE, C.A.; FERNANDES, M.N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the Erythrinids *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus*. Journal of Experimental Zoology, v. 298, p. 93-104, 2003.
- NAVARRO LINS, J. A. P.; KIRSCHNIK, P. G.; QUEIROZ, V. S.; CIRIO, S. M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. Revista Acadêmica – Ciências Agrárias e Ambientais, Curitiba, v. 4, p. 469-484, 2010.
- NEFF, J.M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Applied Science Publishers Ltd, 1979. 262p.
- OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Cytochrome P4501A, genotoxic and stress responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following short-term exposure to phenanthrene. Chemosphere, v. 66, p. 1284-1291, 2007.
- OMONIYI I.; AGBON, A. O.; SODUNKE, S. A. Effect of lethal and sub-lethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaf dust extract on weight and hematological changes in *Clarias Gariepinus* (Burchell). Journal of Applied Sciences and Environmental Management, v. 6, n. 2, pp. 37-4, 2002.
- OVERSTREET, R. M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. coasts: histopathological indicators. Aquatic Toxicology, v. 11, p. 213 – 239, 1988.
- PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicology Environmental Safety, v. 49, p. 64-75, 2001 a.
- PACHECO M.; SANTOS M. A. Tissue distribution and temperature-dependence of *Anguilla anguilla* L. EROD activity following exposure to model inducers and relationship with plasma cortisol, lactate and glucose levels. Environment International, v. 26, p.149-155, 2001 b.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicology and Environmental Safety, v. 53, p. 331 – 347, 2002.
- PAMPLONA, J. H. Avaliação dos efeitos tóxicos da dipirona sódica em peixe *Rhamdia Quelen*: estudo bioquímico, hematológico e histopatológico. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em farmacologia – Universidade Federal do Paraná, 2009, 70p.
- PANDEY, S.; PARVEZ, S.; SAYEED, I.; HAQUE, R.; BIN-HAFEEZ, B.; RAISUDDIN, S. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu*. Science of the Total Environment, v. 309, p. 105-115, 2003.
- PASSANTINO, L.; CIANCIOTTA, A.; PATRUNO, R.; RIBAUD, M.R.; JIRILLO, E.; PASSANTINO, G.F. Do fish thrombocytes play an immunological role? Their cytoenzimatic profiles and function during an accidental piscine candidiasis in aquarium. Immunopharmacology and Immunotoxicology, v. 7, p. 345-356, 2005.

- PAULINO, M. G. Efeito da exposição à atrazina nas brânquias de curimatá, *Prochilodus lineatus* (Teleosteo, Prochilodontidae). Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências fisiológicas – Universidade Federal de São Carlos, 2011, 118p.
- PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. *Journal of Crustacean Biology*, v. 1, n.15, p. 1 – 60, 1995.
- PISAM, M.; RAMBOURG, A. Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach. *International Review of Cytology*, 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.
- PRETTI, E.; CAVALCANTE, D.; SIMONATO, J.D.; MARTINEZ, C.B.R. Ensaio do cometa e indução de anormalidades eritrocíticas nucleares para detecção de genotoxicidade e mutagenicidade no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos à fração solúvel da gasolina. *Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil*, Caxambu, MG, Brasil, 2007.
- PUC – RIO. Os hidrocarbonetos e a importância de seu estudo no ambiente. Disponível em: <http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/9916756_03_cap_03.pdf>. Acesso em: 09 out. 2011.
- QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General and Comparative Endocrinology*, v. 108, p. 472-482, 1997.
- RAJBANSHI, V.K.; GUPTA, A.K. Alterations in the architecture of gill surface produced by water-borne copper in *Hepteteroneusters fossilis* (Bloch). *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, v. 16, p. 325-332, 1988.
- RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and Applications*. Hemisphere Publishing, 1985, 666p.
- RANDALL, D.J.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. *Fisiologia animal: mecanismos e adaptações*. 4ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 1999. 729 p.
- REBOUÇAS, A.C. Água doce no mundo e no Brasil. IN: REBOUÇAS, A.C., BRAGA, B. and TUNDISI, J.G. (eds.). *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. Editora Escrituras, São Paulo, SP, 1999.
- REIMSCHUESSEL, R. A fish model of renal regeneration and development. *Iilar Journal*, v.42, p. 285 – 291, 2001.
- REIS FERREIRA, G.; NEPOMUCENO, J. C. Poluição do rio Santa Catarina no município de Vazante (MG) detectada por meio do teste do micronúcleo em peixes. *Perquirere – Revista Eletrônica de Pesquisa – Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa e Extensão (NIPE) do Centro Universitário de Patos de Minas (UNIPAM)*, Ed. 5, ano 5, 2008.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. *The check list of the freshwater fishes of south and central America*. Edipucrs. Porto Alegre, RS. 2003.
- RIBEIRO, E. A. Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (Benzeno, Tolueno e Xileno) no peixe *Sphoeroides testudineus* (Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos. Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em biologia celular e molecular – Universidade Federal do Paraná, 2007, 60p.
- RIBEIRO, S. M.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media. *Bioscience Journal*, v.12, p. 133-149, 2005.
- RUAS, C.B.G.; CARVALHO, C.S.; ARAÚJO, H.S.S.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; FERNANDES, M.N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a polluted river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 71, p. 86-93, 2008.

- SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; SAKURAGUI, M.M.; PAULINO, M.G.; FERNANDES, M.F. Using condition factor and blood variable biomarkers in fish to assess water quality. *Environmental Monitoring and Assessment*. DOI 10.1007/s10661-010-1810-z, 2010.
- SAKURAGUI, M.M.; SANCHES, J.R.; FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Comparative Physiology*, v.173, p. 309-317, 2003.
- SAMPSON, B. J.; BECKMAN, J.S. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 392, p. 8-13, 2001.
- SANCHO, E.; FERRANDO, M.D.; ANDREU, E. Inhibition of Gill Na⁺,K⁺-atpase Activity in the Eel, *Anguilla anguilla*, by Fenitrothion. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 38, p. 132–136, 1997.
- SANTANA, L. M. B. M. Biomarcadores histopatológicos para o monitoramento ambiental da bacia do ribeirão Jacutinga (Londrina,PR). Monografia apresentada ao curso de graduação em ciências biológicas – Universidade Estadual de Londrina, 2004, 64p.
- SANTOS, T. R. M. Análises histopatológicas de tilápias e curimbas expostos aos agrotóxicos nim e roundup. Monografia apresentada ao curso de graduação em ciências biológicas – Universidade Estadual de Londrina, 2005, 54p.
- SCANDALIOS, J.G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, p. 995–1014, 2005.
- SCHLENK, D.; DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to cooper sulphate. *Aquaculture*, v. 177, p. 367-379, 1999.
- SCHMIDT – NIELSEN, K. *Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente*. 5.ed. São Paulo: Santos, 1996, 600p.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, v. 6, n. 1, p. 75-86, 1997.
- SERPUNIN, G. G.; LIKHATCHYOVA, O. A. Use of the ichthyohaematological studies in ecological monitoring of the reservoirs. *Acta Veterinaria*, v. 67, p. 339-345, 1998.
- SHAILAJA, M.S.; CLASSY D'SILVA, C. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*, v. 53, p. 835–841, 2003.
- SHIKANO, T.; FUJIO, Y. Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase in branchial epithelium of chum salmon fry during seawater and freshwater acclimation. *Journal of Experimental Biology*, v. 201, p. 3031–3040, 1998.
- SIES, H. 1985. *Oxidative stress*. London; Academic. 507 p.
- SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. N.; CUNHA BASTOS, V. L. F.; ALVES, M.V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas par biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M. B.; ROCHA, O.; BOHRER, M. B. C.; OLIVEIRA NETO, A. L. Eds. *Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI*. São Carlos: RIMA, p.147 – 164, 2000.
- SILVA, G. A. Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências biológicas – Universidade Estadual de Londrina, 2004, 80p.
- SILVEIRA-COFFIGNY, R.; PRIETO-TRUJILLO, A.; ASCENCIO-VALLE, F. Effects of different stressors in haematological variables in cultured *Oreochromis aureus*. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, v. 139, p. 245-250, 2004.

- SIMONATO, J. D. Biomarcadores funcionais e histológicos associados à exposição do peixe *Prochilodus lineatus* ao óleo diesel. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006, 68 p.
- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 69, n. 1, p. 112-120, 2008.
- SIMONATO, J.D. Efeitos da exposição à fração solúvel da gasolina em parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *P. lineatus*. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em ecologia e recursos naturais – Universidade Federal de São Carlos, 2010, 80p.
- SOUZA, L. R. Alterações fisiológicas e bioquímicas no peixe-rei estuarino (*Atherinella brasiliensis*, Atheriniformes: Atherinopsidae) após a explosão do navio vicuña na baía de paranaguá, Paraná, Brasil. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em ciências biológicas - zoologia, setor de ciências biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2007, 96p.
- STEGEMAN, J. J.; BROWER, M.; DI GIULIO, R. T.; FÓRLIN, L.; FOWLER, B. A.; SANDERS, B. M.; VELD, P. A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE Jr., P. P.; BERGMAN, H. L. (Ed), *Biomarkers. Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Chelsea, Eds. Lewis Publishers, p. 235-335, 1992.
- STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p.1715-1733, 1996.
- STOSKOPF, M.K. *The veterinary clinics of north america*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1988. 473 p.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. *An atlas of fish histology normal and pathological features*. 2.ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995.
- TAKASUSUKI, J.; ARAUJO, M. R. R.; FERNANDES, M. N. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 72, p. 1075–1082, 2004.
- TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. *Hematologia de peixes teleósteos*. Ribeirão Preto: Villimpress Complexo Gráfico, 2004.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, v. 37, p. 51 – 70, 1997.
- TELES, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M.A. *Anguilla anguilla* L. ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and naphthoflavone. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 55, p. 98-107, 2003.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*. v. 121, p. 307 – 320, 2003.
- UNEP/IOC/ICES - UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME. Review of contaminants in marine mammals. *Marine Mammal Technical Report*, n. 2, p. 23, 1991.
- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, p.57-149, 2003.

- VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effect of diesel oil water-soluble fraction on an neotropical fish species. *Mutation Research*, v. 631, n. 1, p. 36-43, 2007.
- VARGAS, V. M. F.; MIGLIAVACCA, S.B.; MELO, A.C.; HORN, R.C.; GUIDOBONO, R. R.; FERREIRA, I. C.; PESTANA, M. H. Genotoxicity assessment in aquatic environments under the influence of heavy metals and organic contaminants. *Mutation Research*, v. 490, p. 141-158, 2001.
- VAZZOLER, A. E. A. M. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: EdUEM, 1996, 196p.
- VEIGA, M. L.; RODRIGUES, E. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus*, Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 45, p. 171 – 175, 2002.
- VEINTEMILLA, C.A.C. Impactos do fenantreno sobre o tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818: CL50, crescimento e hematologia. Dissertação de mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em biologia tropical e recursos naturais do convênio INPA/UFAM, 2006, 58p.
- VITALE, A. M.; MONSERRAT, J.M.; CASTHILO, P.; RODRIGUEZ, E.M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 122, p. 121–129, 1999.
- VRANA, B.; PASCHKEA, A.; POPP, P. Polyaromatic hydrocarbon concentrations and patterns in sediments and surface water of the Mansfield region, Saxony-Anhalt, Germany. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 3, p. 602–609, 2001.
- WENDELAAR BONGA, S. E. The Stress Response in Fish. *Physiological Review*, v. 77, n. 3, p. 591- 620, 1997.
- WIDDOWS, L.; JOHNSON, D. Physiological energetic of *Mytilus edulis*: scope for growth. *Marine Ecology Progress Series*, v. 46, p. 113-121, 1988.
- WILHELM-FILHO, D.; MARCON, J.L. Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: Val, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, p. 299-312, 1996.
- WILHELM-FILHO, D.; TORRES, M.A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R.C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, v. 244, p. 349-357, 2005.
- WILSON, J.M.; LAURENT, P. Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, v. 293, p. 192–213, 2002.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace*. Geneva: ONU, 1996.
- YOSHINAGA, K.; OKAMOTO, N.; KURATA, O.; IKEDA, Y. Individual variations of natural killer activity of rainbow trout leucocytes against IPN virus-infected and uninfected RTG-2 cells. *Fish Pathology*, v.29, p.1-4, 1994.
- ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações*, 2008.
- ZAUGG, W.S. A simplified preparation for adenosine triphosphatase determination in gill tissue. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, v. 39, p. 215-217, 1982.
- ZHANG, J.F.; SHEN, H.; XU, T.L.; WANG, X.R.; LI, W.M.; GU, Y.F. Effects of long-term exposure of low-level diesel oil on the antioxidant defense system of fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 71, p. 234-239, 2003.
- ZUCKER, E. Hazard evaluation division. Standard evaluation procedure. Acute toxicity test for freshwater fish. USEPA publication 540/9-85-006, 1985, 17p.