

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

MARCELA SANTOS PROCÓPIO

**“INFLUÊNCIA DO SEXO EM *Prochilodus argenteus* NA
DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DE IMPACTO AMBIENTAL EM RIO CONTAMINADO
POR METAIS”**

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

2013

**“INFLUÊNCIA DO SEXO EM *Prochilodus argenteus* NA
DETERMINAÇÃO DE BIOMARCADORES MORFOLÓGICOS E
BIOQUÍMICOS DE IMPACTO AMBIENTAL EM RIO CONTAMINADO
POR METAIS”**

Dissertação apresentada a
Universidade Federal de Minas Gerais,
como parte das exigências do Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular, para a
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular.

Orientador: Dr. José Dias Corrêa Júnior

BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS

2013

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interações Físico-Químicas e da Reprodução Animal (LIQBRA), Centro de Microscopia Eletrônica – CEMEL (ICB – UFMG) e Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CODEVASF) com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*Dedico esse trabalho aos meus familiares, em especial
Meu pai Geraldo, minha mãe Mariza, meus irmãos Aline e Lucas*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por deixar os caminhos mais livres.

Ao Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior, meu orientador, pela preocupação de sempre ensinar da melhor maneira possível.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Santana Castro pela divertida convivência e aconselhamentos.

Ao Professor Dr. José Carlos Nogueira pelos frequentes momentos culturais, momentos econômicos e também por aprimorar o meu vocabulário em francês.

À Professora Dra. Elizete Rizzo pelo apoio na execução do projeto.

Ao Dr. Yoshimi Sato pelo essencial apoio logístico na realização das coletas.

Ao Professor Dr. Hélio Chiarini Garcia quem sempre esteve disposto a ajudar.

Ao Professor Dr. Remo de Castro Russo do Departamento de Fisiologia, pelo empenho nas análises bioquímicas e ajuda essencial na interpretação dos resultados.

A Professora Dra. Patrícia Massara Martinelli por contribuir com esse projeto.

Ao eterno amigo, Heder por todos os ensinamentos, pela amizade e por me aguentar desde quando eu mascava chicletes há 6 anos atrás.

Às colegas de laboratório e grandes amigas Betânia, Juliana e Kelly pela amizade e pronta ajuda.

Ao amigo Chico pelos choques de realidade e também ajuda nas coletas.

Aos colegas do Laboratório de Ictiohistologia do Departamento de Morfologia pela constante auxílio.

À Samyra e Paulo, colegas do Laboratório de Biologia Celular (Departamento de Morfologia da UFMG), que gentilmente colaboraram com esse projeto.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e a todos os professores que fazem parte do programa e que contribuíram para minha formação.

Aos amigos e organizadores do V Simpósio de Biologia Celular, pela harmoniosa convivência.

À Diana secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular.

Aos pescadores da Estação de Piscicultura e Hidrobiologia de Três Marias pela valorosa ajuda na coleta dos animais.

Aos amigos e colegas do Pós-Graduação, em especial, Priscila Valadão, Marina Viveiros, Patrícia Lanza, Luciana Xavier, Vanessa Andrade e Tatiane Almeida pelos momentos de descontração.

À minha família com quem divido essa conquista, Meu pai Geraldo, minha mãe Mariza, meus irmãos, Aline e Lucas. Sem vocês não seria possível chegar aqui!

A minha segunda família, os Deboaceae: Camila, Cadu, Eudes, Fernando, Fazito, Luara, Mariana, Marina, Nathália, Pedro, Rafael, Sávio, Tarcísio e Vinícius por tornar a vida muito mais divertida.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, seja com pensamento positivo, conselhos e uma palavra de incentivo, o meu muito obrigado.

“Seja qual for o seu sonho, comece.

Ousadia tem genialidade, poder e magia”

Goethe

RESUMO

Brânquias de peixes tem sido analisadas visando a utilização da morfologia e elementos do sistema imunológico inato como biomarcadores da qualidade de ambientes aquáticos. Apesar dos vários estudos, poucos abordam as respostas considerando o gênero dos peixes. Em mamíferos, o sexo influencia na susceptibilidade dos animais aos contaminantes ambientais como metais pesados. Entretanto, em teleósteos essa influência é pouco conhecida. Dessa forma, nesse estudo iremos descrever o comportamento de algumas variáveis biológicas em brânquias do peixe *Prochilodus argenteus* visando a utilizá-las como biomarcadores na avaliação de dois pontos no Rio São Francisco. A caracterização ambiental dos pontos de coleta no Rio São Francisco foi realizada, e observou-se alta concentração de Cd na água e de Cd e As no sedimento do ponto de estudo logo a jusante da barragem, nas proximidades da Votorantim Metais Zinco S.A. As histopatologias apresentaram diferentes comportamentos de acordo com os pontos de estudo e o gênero dos animais, assim como os parâmetros imunológicos. Dessa forma, o presente trabalho mostra que alguns marcadores avaliados podem ser utilizados como biomarcadores na região de estudo e concluímos que o gênero dos animais exerce grande influência na resposta dos animais aos contaminantes ambientais. Como a jusante da represa de Três Marias é considerada uma região de prioridade de conservação do Rio São Francisco, esses biomarcadores poderão auxiliar em programas de monitoramento ambiental na região.

ABSTRACT

Fish gills have been analyzed in order to use the morphology and elements of the innate immune system as biomarkers to assess the aquatic environment quality. Despite several studies, few approach the biomarkers answers considering the gender of the fish. In mammals, sex influences the susceptibility of animals to environmental contaminants such as heavy metals. However, in teleosts this influence is not well known. Thus, in this study we describe the behavior of some biological variables in gills of fish *Prochilodus argenteus* in order to use them as biomarkers in the evaluation of two points of São Francisco River. The environmental characterization of the collection points in the São Francisco River was held, and there was a high concentration of Cd in water and Cd and As in the sediment of the studied point localized just downstream of the dam, near the Votorantim Metals Zinc S.A. The histopathologies showed different behaviors according to the points of study and gender of the animals, as well as the immunological parameters. Thus, this study shows that some biological variables can be used as biomarkers in the study area and concluded that the gender has great influence on the response of animals to environmental contaminants. As downstream of the Three Marias is considered a conservation priority area of the São Francisco River, these biomarkers may assist in environmental monitoring programs in the region.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. Critérios de avaliação da qualidade ambiental adotados pela legislação brasileira | 2 |
| 2. Impactos causados por ação antrópica na região da Represa de Três Marias, no Rio São Francisco | 6 |
| 3. <i>Prochilodus argenteus</i> como potencial bioindicador | 9 |
| 4. Brânquia de teleósteos | 11 |
| 5. Brânquia de teleósteos como órgão estratégico para a definição de biomarcadores | 12 |
| 6. Biomarcadores de impacto ambiental | 14 |
| 7. Biomarcadores avaliados no presente estudo | 16 |
| 7.1. Fator de condição de Fulton (K) | 16 |
| 7.2. Biomarcadores histopatológicos | 17 |
| 7.3. Biomarcadores imunológicos | 18 |
| 7.3.1. Células rodlets e proteína S100 | 19 |
| 7.3.2. Mieloperoxidase (MPO) e Peroxidase eosinofílica (EPO) | 22 |
| 7.3.3. Células mucosas | 23 |
| OBJETIVOS | 26 |
| 1. Objetivo geral | 26 |
| 2. Objetivos específicos | 26 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 1. Local de estudo | 28 |
| 2. Caracterização física e química dos pontos de amostragem | 29 |
| 2.1. Medidas de parâmetros físico-químicos da água | 30 |
| 2.2. Determinação da concentração de metais dissolvidos em água | 30 |
| 2.3. Avaliação de metais em sedimento | 30 |
| 3. Coleta e biometria | 31 |
| 4. Processamento histológico das brânquias | 32 |
| 4.1. Eutanásia e dissecação | 32 |
| 4.2. Histologia | 32 |
| 4.3. Caracterização morfológica das brânquias de <i>P. argenteus</i> | 33 |
| 5. Análise morfométrica das patologias do epitélio branquial | 34 |
| 6. Quantificação da ocorrência de células rodlet em espaços interlamelares | 35 |
| 7. Análise das células mucosas do epitélio branquial | 35 |
| 7.1. Avaliação da distribuição das células mucosas do tipo A, B e C e do muco presente no espaço interlamelar | 36 |
| 8. Quantificação bioquímica de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) | 37 |
| 8.1. Mieloperoxidase (MPO) | 37 |
| 8.2. Peroxidase eosinofílica (EPO) | 38 |

| | | |
|-----|---------------------------------------|----|
| 9. | Histoquímica de MPO | 39 |
| 10. | Imunohistoquímica para S100 | 40 |
| 11. | Microscopia Eletrônica de Transmissão | 42 |
| 12. | Análises estatísticas | 44 |

RESULTADOS 46

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Caracterização física e química dos pontos de amostragem | 46 |
| 1.1. | Medidas de parâmetros físico-químicos da água | 46 |
| 1.2. | Avaliação de metais dissolvidos em água | 46 |
| 1.3. | Avaliação de metais pesados em sedimento | 47 |
| 2. | Biometria | 48 |
| 2.1. | Fator de Condição de Fulton (K) | 48 |
| 3. | Descrição histológica da brânquia de <i>Prochilodus argenteus</i> em condições normais | 49 |
| 4. | Descrição ultraestrutural do epitélio da brânquia de <i>Prochilodus argenteus</i> em condições normais | 51 |
| 5. | Alterações histopatológicas encontradas no epitélio branquial de <i>P. argenteus</i> coletados nos pontos de estudo | 55 |
| 6. | Análise morfométrica das patologias no epitélio branquial | 57 |
| 6.1. | Fusão lamelar | 57 |
| 6.2. | Hiperplasia lamelar | 59 |
| 6.3. | Edema lamelar | 60 |
| 6.4. | Focos de infiltrado inflamatório | 61 |
| 7. | Imunohistoquímica para S100 em células rodlet | 62 |
| 7.1. | Caracterização das diferentes fases de maturação das células rodlet por microscopia eletrônica de transmissão | 64 |
| 7.2. | Quantificação da ocorrência de células rodlet em espaços interlamelares | 67 |
| 8. | Quantificação bioquímica de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO) | 68 |
| 8.1. | Mieloperoxidase | 69 |
| 8.2. | Peroxidase eosinofílica | 70 |
| 9. | Histoquímica de MPO | 70 |
| 10. | Avaliação da distribuição das células mucosas do tipo A, B e C e do muco presente no espaço interlamelar | 73 |

DISCUSSÃO 75

| | | |
|------|--|----|
| 1. | Condições ambientais nos pontos de estudo no Rio São Francisco | 75 |
| 2. | Brânquias de <i>Prochilodus argenteus</i> | 77 |
| 3. | Histopatologias da brânquia de <i>P. argenteus</i> como biomarcadores de impacto ambiental | 79 |
| 4. | Elementos da imunidade inata como marcadores de impacto ambiental | 82 |
| 4.1. | Atividade de MPO e EPO | 82 |
| 4.2. | Células rodlet | 83 |
| 4.3. | Células mucosas | 86 |

| | |
|--|------------|
| CONCLUSÃO | 87 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 88 |
| ANEXOS | 107 |
| 1. Certificado da Comissão de Ética em Experimentação Animal | 107 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Desenho científico do teleósteo <i>Prochilodus argenteus</i> _____ | 10 |
| Figura 2: Esquema apresentando a organização estrutural da brânquia de peixes teleósteos_____ | 11 |
| Figura 3: Esquema representando a ordem sequencial da resposta biológica dos organismos à fontes de estresse_____ | 14 |
| Figura 4: Esquema representando a resposta dos organismos a contaminantes ambientais_____ | 15 |
| Figura 5: Locais de estudo no Rio São Francisco_____ | 29 |
| Figura 6: Gráfico contendo os valores do fator de condição de Fulton (K)_____ | 48 |
| Figura 7: Micrografias de luz das brânquias de <i>P. argenteus</i> _____ | 50 |
| Figura 8: Eletromicrografia de transmissão das brânquias de <i>P. argenteus</i> _____ | 53 |
| Figura 9: Micrografias eletrônicas de transmissão de células localizadas no filamento entre as lamelas de <i>P. argenteus</i> _____ | 54 |
| Figura 10: Patologias do epitélio branquial de <i>P. argenteus</i> _____ | 56 |
| Figura 11: Gráficos contendo a ocorrência de lamelas fusionadas_____ | 58 |
| Figura 12: Gráficos contendo a ocorrência de lamelas que apresentaram hiperplasia_____ | 59 |
| Figura 13: Gráficos contendo a ocorrência de edemas lamelares_____ | 60 |
| Figura 14: Gráficos mostrando a ocorrência de focos inflamatórios nos espaços interlamelares_____ | 61 |
| Figura 15: Micrografias de luz das brânquias de <i>P. argenteus</i> submetidas a imunohistoquímica para proteína S100_____ | 63 |
| Figura 16: Eletromicrografias de células rodlet em diferentes estádios de desenvolvimento no epitélio de <i>P. argenteus</i> _____ | 65 |
| Figura 17: Eletromicrografias de células rodlet_____ | 66 |

Figura 18: Gráfico contendo a porcentagem de espaços interlamelares com a presença de células rodlet_____ 67

Figura 19: Gráficos contendo a taxa de absorvância de MPO em brânquias de animais dos diferentes gêneros coletados nos dois pontos de estudo_____ 68

Figura 20: Gráficos contendo a taxa de absorvância de EPO em brânquias de animais dos diferentes gêneros coletados nos dois pontos de estudo_____ 69

Figura 21: Gráficos mostrando correlação linear positiva entre a taxa de absorvância de MPO e a de EPO_____ 70

Figura 22: Micrografias de luz das brânquias de *P. argenteus* apresentando marcação em negro para MPO_____ 71

Figura 23: Gráficos mostrando a distribuição de frequência de estruturas marcadas pela histoquímica para MPO em espécimes machos_____ 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Parâmetros do Índice de Qualidade das Águas e seus respectivos pesos_____ 3
- Tabela 2:** Parâmetros do Índice de Contaminação por Tóxicos (ICT)_____ 4
- Tabela 3:** Valores correspondentes à condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), taxa de oxigênio dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), turbidez (UNT) e pH obtidos nos dois pontos de estudo_____ 46
- Tabela 4:** Concentração em $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de metais dissolvidos presentes na água coletada nos dois pontos de estudo_____ 47
- Tabela 5:** Concentração em $\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de metais pesados presentes no sedimento coletado nos dois pontos de estudo_____ 47
- Tabela 6:** Valores em porcentagem do volume ocupado pelos diferentes tipos de muco nas diferentes regiões da brânquia entre os pontos de estudo_____ 74
- Tabela 7.** Valores em porcentagem do volume ocupado pelos diferentes tipos de muco nas diferentes regiões das brânquias de machos coletados nos dois pontos de estudo_____ 74
- Tabela 8.** Valores em porcentagem do volume ocupado pelos diferentes tipos de muco nas diferentes regiões das brânquias de fêmeas coletadas nos dois pontos de estudo_____ 74

LISTA DE ABREVIATURAS

µm: Micrômetro

AL: Alagoas

ANA: Agência Nacional das Águas

As: Arsênio

CA: Califórnia

Cd: Cádmio

CEMEL: Centro de Microscopia Eletrônica

CETEA – UFMG: Comitê de Ética em Experimentação Animal – Universidade Federal de Minas Gerais

CETEC: Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais

CETESB: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CM: Células mucosas

cm: Centímetros

CMI: Células mucosas imaturas

CMM: Companhia Mineira de Metais

CNE: Células neuroepiteliais

C^o: Graus Celsius

CODEVASF: Companhia de Desenvolvimento dos Vales dos Rios São Francisco e Parnaíba

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CP: Comprimento padrão

CPV: Células pavimentosas

Cr: Cromo

CRM: Células ricas em mitocôndria

CT: Comprimento total

DAB: Diaminobenzidina

DBO_{5,20}: oxigênio consumido na degradação da matéria orgânica, a uma temperatura média de 20°C durante 5 dias

EPM: Erro padrão da média

EPO: Peroxidase Eosinofílica

Epx: Gene da peroxidase eosinofílica

Fe: Ferro

H&E: Hematoxilina e eosina

h: Horas

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: Ácido sulfúrico

HETAB: Brometo de exadeciltrimetilamonio

Hg: Mercúrio

HOCl: Hipocloreto

IBAMA: Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICT: Índice de Contaminação por Tóxicos

IEF/MG: Instituto Estadual de Florestas do Estado de Minas Gerais

IGAM: Instituto Mineiro de Gestão de Águas

IL-10: Interleucina 10

IQA: Índice de Qualidade das Águas

IVA: Índices de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática e de Comunidades Aquáticas

JA: ponto de estudo á jusante da confluência com o Rio Abaeté

JB: ponto de estudo à jusante do reservatório da represa

K: Fator de condição de Fulton

Km: Kilometros

L: Litros

Log: Logarítimo

m³: Metros cúbicos

ml: Mililitros

Mn: Manganês

MPO: Mieloperoxidase

Mpx: Gene da mieloperoxidase

Na₂EDTA: Sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético

Na₃PO₄: Fosfato de Sódio

NaCl: Cloreto de sódio

O: Oeste

OPD: O-fenilenodiamina

PAS: Ácido periódico de Schiff

PAS-AB: Ácido periódico de Schiff combinado com azul de Alcian

Pb: Chumbo

PBS: Tampão fosfato

PBS-BSA: Tampão fosfato com albumina bovina sérica

PC: Peso corporal

PCBs: Bifenilos policlorados

PEL: *Probable effect level*

pH: Potencial Hidrogeniônico

Pi: Células de pilar

rpm: Rotações por minuto

S: Sul

SE: Sergipe

TEL: *Threshold effect level*

TMB: 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina

UNT: Unidade nefelométrica de turbidez

US NRC: *United States National Research Council*

USA: Estados Unidos

VGQS: Valores Guias de Qualidade de Sedimento

WHO: *World Health Organization*

Zn: Zinco

α -MSH: Hormônio estimulador de melanócitos

μ g: Micrograma

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Nas últimas décadas, o aumento das atividades antrópicas tem gerado crescente processo de degradação ambiental. A liberação de esgoto doméstico, descargas de efluentes industriais, agrícolas e a presença de barragens hidrelétricas são descritos como as principais causas de degradação dos ambientes aquáticos (Agostinho, 1992; Bernet et al, 1999; Sampaio e López, 2003; Velkova-Jordanoska e Kostoski, 2005).

Nesse contexto, estudo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontou que a redução da quantidade, qualidade do pescado e poluição das águas na bacia do Rio São Francisco representa um problema ambiental de grande impacto social e um dos maiores problemas ambientais da Bacia. Nos municípios da bacia do Rio São Francisco analisados, 38% apresentaram ocorrência de poluição nos corpos d'água. Em 21% dos municípios houve redução da quantidade/diversidade ou perda da qualidade do pescado, sendo que a alteração do regime hidrológico do rio foi apontada como uma das causas dessa redução. Destaca-se também o comprometimento da região do Alto São Francisco, com exceção do entorno do reservatório de Três Marias (IBGE, 2005).

Entretanto, vários estudos na região do reservatório de Três Marias destacam também a contaminação por metais, além da modificação dos parâmetros físico-químicos da água causado pela represa (Oliveira e Horn, 2006; Silva, 2007; Ribeiro, 2010; Gomes et al, 2010). Adicionalmente, já é relatado prejuízos na reprodução de peixes, dentre eles a curimatá (*Prochilodus argenteus*) coletada imediatamente à jusante do reservatório de Três Marias, demonstrando que a

poluição nessa região já causa comprometimento na manutenção da vida aquática. Contudo, após a confluência do rio São Francisco com o rio Abaeté, os animais apresentaram reestabelecimento da capacidade reprodutiva (Sato et al, 2005; Arantes et al, 2011).

Como a jusante da barragem de Três Marias é considerada uma área prioritária para a conservação de biodiversidade do estado de Minas Gerais devido à riqueza e à presença de espécies endêmicas de peixes, é necessário o estabelecimento de biomarcadores de impacto ambiental visando o melhor monitoramento do local (Costa et al, 1998). Dessa forma, considerando que a espécie *Prochilodus argenteus* é endêmica e de destaque econômico no rio São Francisco, bem como as brânquias são órgãos importantes para a determinação de biomarcadores, o presente estudo visa, além de estabelecer alguns biomarcadores em brânquias de *P. argenteus*, avaliar a influência do sexo dos animais coletados no rio São Francisco, no comportamento dos mesmos.

1. Critérios de avaliação da qualidade ambiental adotados pela legislação brasileira

Os critérios de qualidade da água são atualmente regidos pela resolução N° 357 de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que “dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências para águas superficiais inseridas em território nacional”. Essa resolução estabelece parâmetros máximos de poluentes

orgânicos e inorgânicos (metais) para a classificação dos corpos d'água. Para cada classe engloba os diferentes tipos de usos, sendo os critérios mais restritos para as águas de classe especial e classe I e mais abrangentes para as águas de classe 3.

Apesar de a legislação apontar que os parâmetros químicos estipulados devem estar associados aos estudos toxicológicos, a Agência Nacional das Águas não utiliza esses ensaios, sendo que a última avaliação nacional da qualidade das águas superficiais no Brasil foi baseada principalmente no Índice de Qualidade das Águas (IQA). O IQA, elaborado em 1970 pelo *National Sanitation Foundation* (NSF) dos Estados Unidos (USA), possui o objetivo de avaliar a qualidade das águas para consumo humano. Entretanto, esse índice atribui diferentes pesos aos parâmetros apontados na tabela abaixo, não considerando a presença de metais e outros contaminantes orgânicos (ANA 2005).

Tabela 1. Parâmetros do Índice de Qualidade das Águas (IQA) e seus respectivos pesos.

| Parâmetros | Pesos (w) |
|---|-----------|
| Oxigênio dissolvido | w= 0,17 |
| Coliformes fecais | w= 0,15 |
| Potencial hidrogênionico (pH) | w= 0,12 |
| Demanda bioquímica de oxigênio (DBO _{5,20}) | w= 0,10 |
| Temperatura | w= 0,10 |
| Nitrogênio Total | w= 0,10 |
| Fósforo total | w= 0,10 |
| Turbidez | w= 0,08 |
| Resíduo total | w= 0,08 |

w: peso do fator.

Fonte: Relatório ANA 2005

O Instituto Mineiro de Gestão de Águas (IGAM) utiliza nos programas de monitoramento o Índice de Contaminação por Tóxicos (ICT), baseado no CONAMA 357/2005, que classifica os corpos d'água em função das concentrações observadas dos seguintes parâmetros: Amônia, Arsênio total, Bário total, Cádmio total, Chumbo total, Cianeto livre, Cobre total, Cobre dissolvido, Cromo hexavalente, Cromo total, Fenóis totais, Mercúrio total, Nitritos, Nitratos e Zinco total. A contaminação por tóxicos é classificada em Baixa, Média ou Alta, de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 2. Parâmetros do Índice de Contaminação por Tóxicos (ICT).

| Concentração em relação à classe de enquadramento | Classe de Contaminação |
|---|------------------------|
| 1,2. P | Baixa |
| 1,2 P < concentração = 2. P | Média |
| Concentração > 2. P | Alta |

P: Limite de classe definido pela Resolução CONAMA nº 357/2005 ou pela Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG N.º 1, de 05 de Maio de 2000. Fonte: IGAM.

Nesse índice considera-se a pior situação dos conjuntos de dados adotados. Dessa forma, se um dos parâmetros acima apresentou valor acima de 100% (o dobro da concentração limite), a contaminação no ponto de amostragem será classificada como alta. Entretanto, somente alguns estados brasileiros avaliam a contaminação por metais nos programas de monitoramento da qualidade das águas superficiais (Umbuzeiro, 2006). Ainda assim, mesmo que um corpo de água possua alto ICT, as atividades de recreação de atividade primária não

podem ser suspensas, uma vez que a resolução CONAMA N° 274/2000, baseada em parâmetros microbiológicos, se sobrepõe à CONAMA N° 357/2005.

Como pode ser observado, a maioria das legislações visam o controle da qualidade das águas para o beneficiamento humano. Entretanto, a CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) realiza a avaliação da qualidade das águas visando a proteção de fauna e flora aquáticas por meio do Índice de Qualidade das Águas para Proteção da Vida Aquática e de Comunidades Aquáticas (IVA). Ainda assim, os valores de concentração dos poluentes utilizados nesse índice são baseados no CONAMA 357/2005, mas também em legislações francesas e americanas, o que intensifica a necessidade de associação desses índices com marcadores biológicos de contaminação aquática.

Em relação aos critérios de avaliação da qualidade do sedimento, o Brasil não possui legislação que regulamenta a qualidade do sedimento enquanto ele se dispõe no ambiente natural, somente do sedimento a ser dragado e disposição do mesmo pela CONAMA N° 344 de 2004. Dessa forma, para a análise de sedimentos, vários estudos ambientais utilizam os Valores Guias de Qualidade de Sedimento (VGQS) (Mozeto et al, 2006). O VGQS é baseado no “*Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*” e estabelece dois níveis de acordo com os efeitos biológicos gerados. O TEL (*Threshold effect level*), que determina a concentração mínima do poluente em que o provável efeito tóxico sobre os organismos é mínimo e o PEL (*Probable effect level*) em que determina a concentração na qual acima dela, existe provável toxicidade dos

organismos em contato com esse sedimento (*Canadian Council of Ministers of the Environment*, 2002).

Entretanto, o VGQS deve ser utilizado como parâmetro de orientação e não como determinante de toxicidade, uma vez que os valores são baseados em estudos toxicológicos de biomonitoramento de rios no Canadá e Estados Unidos. A interferência das diferentes condições climáticas na biodisponibilidade dos metais no ambiente, além da distinta sensibilidade das espécies aos contaminantes, pode levar a interpretações errôneas de determinação de toxicidade (Chapman et al, 1999, Chapman e Anderson, 2005). Assim, a associação desses parâmetros com biomarcadores possibilitaria uma melhor avaliação do ambiente aquático.

2. Impactos causados por ação antrópica na região da represa de Três Marias, no Rio São Francisco, em Minas Gerais.

O rio São Francisco foi descoberto no ano de 1501 e é considerado o rio da integração nacional por ser um dos principais caminhos de ligação do Sudeste com o Nordeste. Desde a sua nascente na Serra da Canastra, no município de São Roque de Minas, à foz, na divisa de Sergipe e Alagoas, entre os municípios de Brejo Grande (SE) e Piaçabuçu (AL), o rio São Francisco totaliza 2.814 km de extensão. Mais recentemente determinou-se que a sua nascente geográfica seria no rio Samburá, no município de Medeiros, em Minas Gerais, estendendo assim o seu percurso total para 2.863 km (CODEVASF, 2002). Devido a sua grande extensão, a bacia é dividida em 4 regiões: i) Alto São Francisco, da nascente até

Pirapora; ii) Médio São Francisco, de Pirapora até Remanso; iii) Sub-médio São Francisco, de Remanso até Paulo Afonso; e iv) Baixo São Francisco, de Paulo Afonso até a foz (Godinho e Godinho, 2003).

O trecho de estudo desse trabalho, de aproximadamente 45 km, está localizado no Alto São Francisco entre a represa de Três Marias e a confluência do Rio Abaeté. Vários fatores antrópicos atuam nesse trecho, dentre eles a Votorantim Metais Zinco S.A (antiga Companhia Mineira de Metais - CMM) localizada à cerca de 1 km da barragem na margem direita do rio, que atua na produção de derivados de zinco e ácido sulfúrico (Sampaio e López, 2003). A CMM começou as suas atividades em 1969, lançando seus rejeitos industriais diretamente, *in natura*, no rio São Francisco, nos córregos Consciência e Barreiro Grande, que posteriormente desaguam no Rio São Francisco. Somente em 1983, a barragem de contenção localizada nas margens do Rio São Francisco foi construída. Em 2001, a empresa depositava seu rejeito diretamente sobre o solo, ocasionando a lixiviação dos metais para zonas mais profundas no solo, e conseqüente contaminação das águas do rio São Francisco (CETEC, 1980; Oliveira e Horn, 2006). Vários trabalhos mostram a contaminação por metais nesse ponto; entretanto, nenhum estudo investiga o potencial efeito tóxico desses contaminantes na fauna local (Oliveira e Horn, 2006; Silva, 2007; Ribeiro, 2010; Gomes et al, 2010).

Outro fator de influência antrópica na região de estudo é a própria represa de Três Marias. Construída em 1960, essa represa teve como objetivos controlar a vazão do rio São Francisco em épocas de cheia, aumentar o tirante de águas

para navegação, ampliar a irrigação, aumentar a potência da usina de Paulo Afonso e produzir energia elétrica. Ela está localizada no alto São Francisco (18°12'51" S 45°15'51" O), apresenta área aterrada de 2.700 m² de extensão e altura máxima de 75 metros. Quando atinge a cota máxima, a área de inundação da represa é de 1.050 km² e o volume da ordem de 21 x 10⁹ m³, com profundidades que atingem 60 m no corpo principal (Godinho e Godinho, 2003). O reservatório apresenta estratificação térmica de novembro a fevereiro, no período do verão, produzindo uma diferença de temperatura entre o epilímnio e o hipolímnio superiores a 3C^o. Além disso, os níveis de oxigênio no hipolímnio são sempre mais baixos que no epilímnio, inclusive quando não há estratificação térmica (Esteves et al, 1985). Dessa forma, a água do hipolímnio, caracterizada por baixas temperaturas (22,5 - 23,5 C^o) e menor quantidade de oxigênio dissolvido, é liberada durante a produção de energia e conseqüentemente descartada no rio São Francisco, a jusante da barragem (Sato et al, 2005). Entretanto, estudos mostram que o rio Abaeté, localizado a cerca de 35 km à jusante da represa, minimiza o impacto causado pela barragem apresentando condições favoráveis para a reprodução de várias espécies, incluindo o curimatá (Sato et al, 2005).

Sato e Godinho (2003) sugerem que a fauna de peixes migradores apresenta diferentes *status* de conservação ao longo da bacia do rio São Francisco. Adicionalmente, a jusante da barragem de Três Marias, foi considerada área prioritária para a conservação de biodiversidade do Estado de Minas Gerais, devido à riqueza e à presença de espécies endêmicas de peixes (Costa et al,

1998). Entretanto, não há estudos que associem a contaminação ambiental por metais no desenvolvimento de alterações teciduais, celulares e bioquímicas em brânquias na espécie *P. argenteus* provenientes dessa região. Além disso, ainda não foram descritos possíveis biomarcadores utilizando brânquias de *P. argenteus*, que seriam úteis no monitoramento da qualidade da água do São Francisco e conseqüentemente na conservação da biodiversidade local.

3. *Prochilodus argenteus* como potencial bioindicador

O teleósteo curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus* (Characiformes: Prochilodontidae) (Fig. 1), é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e possui hábitos detritívoros, alimentando-se de matéria orgânica e microorganismos associados à lama do fundo de lagos e rios (Nakatani et al, 2001). É uma espécie de grande porte podendo chegar a 15 kg de peso corporal (Nakatani et al, 2001). Forma grandes cardumes e realiza migrações durante o período reprodutivo (Sato e Godinho, 2003). Essa espécie possui grande importância econômica, representando cerca de 50% de todo pescado da região de Três Marias e configura-se como importante fonte de alimento para as populações ribeirinhas (Franco de Camargo e Petrere, 2001; Sato e Godinho, 2003).

Os hábitos alimentares dessa espécie possibilitam utilizá-la como modelo biológico para a análise de possível toxicidade de ambientes contendo sedimentos contaminados por metais e outras substâncias (Colombo et al, 2000). Com essa finalidade, modificações de origem histológica, celular bioquímica ou

molecular causadas por diferentes contaminantes estão sendo avaliadas em vários órgãos de peixes e outros animais aquáticos, objetivando estabelecer biomarcadores para a avaliação da qualidade de ambientes aquáticos (Costa et al, 2009; Simonato et al, 2011; Milinkovitch et al, 2011). Entretanto, alguns órgãos merecem destaque, dentre eles a brânquia, por desempenhar diversas funções vitais ao organismo e devido ao seu contato direto e contínuo com o ambiente aquático (Arellano et al, 2003; Evans et al, 2005).



Figura 1. Teleósteo *Prochilodus argenteus*. Elaborado pela ilustradora científica Telma Costa. Universidade de Évora. Portugal.

4. Brânquia de teleósteos

A brânquia é o órgão fisiologicamente mais diversificado em vertebrados. Nos peixes teleósteos, as brânquias desempenham várias funções, dentre elas trocas gasosas, regulação iônica, controle ácido/base, excreção de metabólitos nitrogenados e regulação hormonal (Evans, 1987; Olson, 2002; Evans et al, 2005).

Anatomicamente, as brânquias são constituídas de quatro holobrânquias interpostas por cinco canais branquiais. Cada holobrânquia é constituída por um par de hemibrânquias que são separadas entre si pelo septo interbranquial. A hemibrânquia é formada pelo arco brânquial e por um conjunto de filamentos brânquiais que se inserem perpendicularmente no arco. A região respiratória das brânquias é formada por estruturas filamentosas denominadas lamelas, que são dispostas em fileiras e separadas uma das outras pelos espaços intelamelares por onde a água entra em contato com o órgão (Fig. 2) (Evans et al, 1999; Wilson & Laurent, 2002; Evans et al 2005; Monteiro et al, 2010).

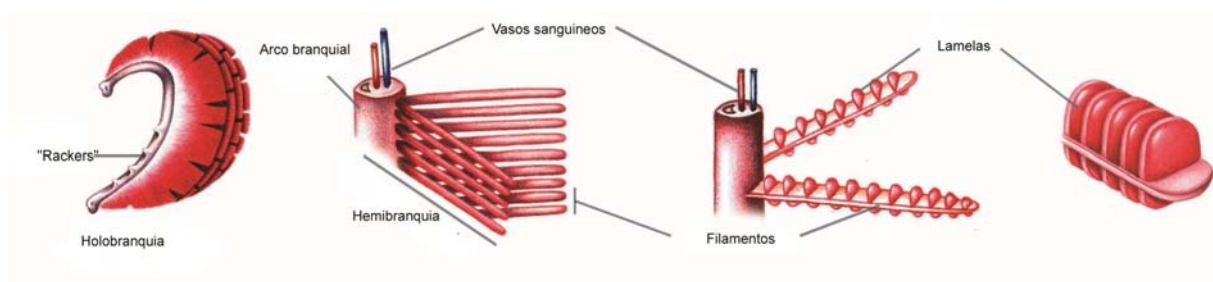


Figura 2. Organização estrutural da brânquia de peixes teleósteos. Desenho realizado pela ilustradora científica Telma Costa. Universidade de Évora. Portugal.

O epitélio branquial reveste toda a estrutura anatômica do órgão. O filamento é revestido por epitélio estratificado, enquanto uma camada contínua de epitélio, formada principalmente por células simples pavimentosas (CPV), reveste as lamelas (Monteiro et al, 2004). As CPV são as células mais abundantes do epitélio branquial, revestindo aproximadamente 90% de toda a superfície do órgão. O formato dessas células, pavimentosa ou cuboidal, favorece o desempenho da função de troca gasosa. As células cloreto também chamadas de células ricas em mitocôndria (CRM), a segunda célula mais abundante no epitélio branquial (<10% da superfície do órgão), são os locais de trocas iônicas, regulação ácido-base e excreção de metabólitos nitrogenados. O terceiro tipo de célula mais abundante, as células mucosas (*goblet*) produzem glicoproteínas e mucinas que agem como bactericidas e promovem proteção física para o epitélio. Outros tipos celulares são encontrados nos espaços interlamelares como as células neuro-epiteliais, células de pilar, células *rodlet*, macrófagos e leucócitos (Maina, 1991; Perry, 1997; Evans et al, 1999; Wilson & Laurent, 2002; Evans et al, 2005; Monteiro et al, 2010).

5. Brânquia de teleósteos como órgão estratégico para a definição de biomarcadores

Devido ao contato direto e contínuo com o meio aquático, a brânquia é um órgão importante para o estudo de possíveis biomarcadores de impacto ambiental. Além disso, a brânquia possui extensa área de contato com o ambiente, representando cerca de 90% da área total da superfície corporal do

peixe (Hughes, 1984; Arellano et al, 2003; Evans et al, 2005). Nesse contexto, componentes do epitélio branquial têm sido estudados como possíveis biomarcadores de impacto ambiental. Histopatologias brânquiais, hiperplasia de determinados tipos celulares e alterações em parâmetros bioquímicos foram observados em peixes provenientes de ambientes contaminados por metais pesados, esgoto doméstico, agrotóxicos e alterações nos parâmetros físico-químicos da água (Jagoe e Haines, 1997; Erkmen e Kolankaya, 2000; Ribeiro et al, 2002; Alberto et al, 2005; Cengiz e Unlu, 2006; Capkin et al, 2006; Akaishi et al, 2007; Linde-Arias et al, 2008; Biagini et al, 2009; Abdel-Moneim et al, 2012). Estudos associando a presença de contaminantes no meio e biomarcadores nas brânquias possibilitaram o aprimoramento das metodologias adotadas pelos programas de monitoramento de qualidade ambiental, sendo esses parâmetros já utilizados por agências toxicológicas americanas (Schmitt e Dethloff, 2000).

6. Biomarcadores de impacto ambiental

Biomarcadores são definidos como medidas que refletem mudanças nas respostas biológicas relacionadas a um ou mais fatores de estresse de origem química, física ou biológica presentes no ambiente. Essas respostas possuem amplo espectro podendo refletir mudanças de origem molecular até comportamentais dos organismos (Fig. 3) (US NRC, 1989; WHO, 1993; Peakall, 1994).

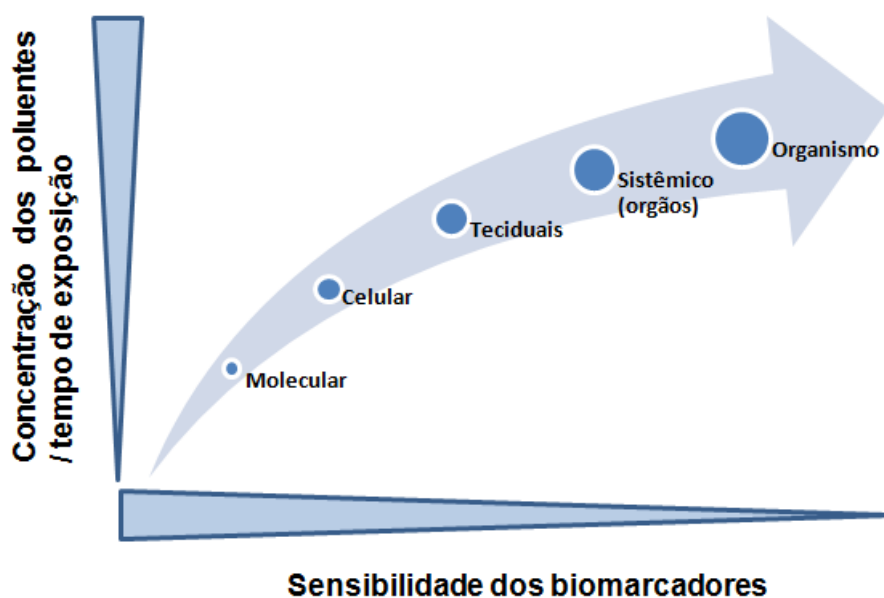


Figura 3. Esquema representando a ordem sequencial da resposta biológica dos organismos à fatores de estresse (Adaptado de Bayne et al, 1985).

Os biomarcadores são divididos em três classes: i) biomarcadores de exposição - detecção do produto de uma interação entre um agente xenobiótico e uma molécula alvo medida dentro de um compartimento do organismo; ii) biomarcadores de efeito - medidas bioquímicas, fisiológicas e outras alterações nos tecidos ou fluidos que podem prejudicar a saúde do animal; iii) biomarcadores

de susceptibilidade - indicam a habilidade (herdada ou adquirida) de um organismo a responder aos agentes xenobióticos, considerando fatores genéticos (WHO, 1993).

Dessa forma, a associação de vários tipos de biomarcadores é indicada para uma eficaz avaliação da degradação ambiental, uma vez que o estresse por determinado contaminante desencadeia uma cascata de respostas biológicas em que, cada uma das quais, pode atuar como biomarcador (Mc Carthy et al, 1991; Triebkorn et al, 2001; Galloway et al, 2004). Dependendo da dose do poluente ou tempo de exposição, as mudanças biológicas que antes eram consideradas fisiológicas ultrapassam esse limiar causando vários efeitos ao longo dos níveis hierárquicos de organização biológica (Fig. 4) (Mc Carthy et al, 1991).

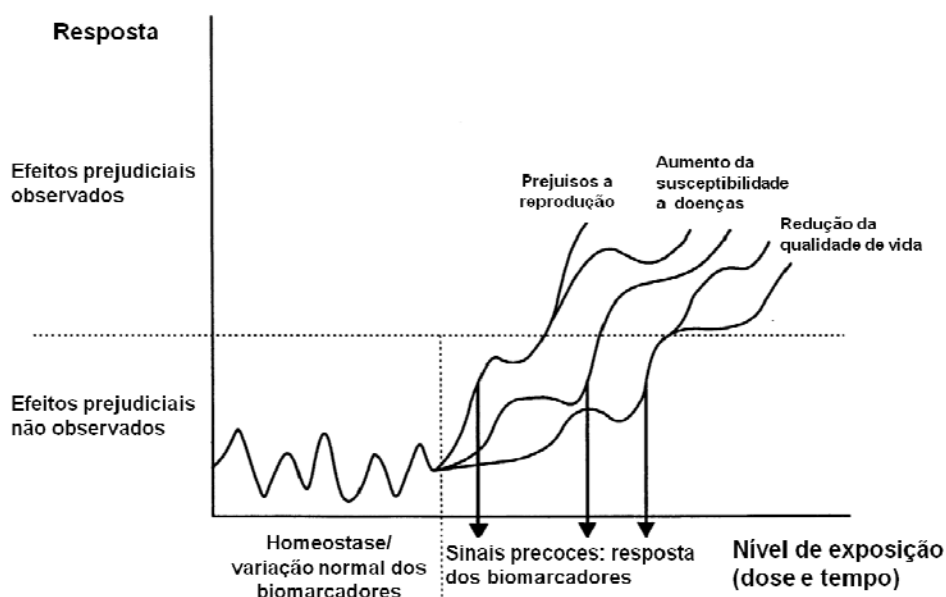


Figura 4. Esquema representando a resposta dos organismos aos contaminantes ambientais (Adaptado de Mc Carthy et al, 1991)

Dessa forma, biomarcadores moleculares, bioquímicos e celulares são mais sensíveis aos poluentes ambientais e detectam precocemente as alterações ambientais antes que essas atinjam níveis hierárquicos mais altos na organização biológica, como a população e comunidade, dificultando ações de intervenção para o melhoramento do ambiente (Calabrese, 1991).

Entretanto, vários fatores modulam as respostas dos biomarcadores e dentre eles se destaca o gênero dos animais (Whyte et al, 2000; Martinez-Alvarez et al, 2005; Burger et al, 2007). Apesar de alguns estudos já utilizarem vários biomarcadores em diferentes níveis hierárquicos da organização biológica para a avaliação de ambientes possivelmente contaminados (de la Torre et al, 2005; Akaishi et al, 2007; Domingos et al, 2007; Linde-Arias et al, 2008; Dabrowska et al, 2012), poucos estudos consideram a influência do gênero dos animais na determinação desses biomarcadores (Vega-López et al, 2007; Linde-Arias et al, 2008). Além de aprimorar a interpretação dos dados, a discriminação das respostas biológicas de acordo com o sexo dos animais contribuiria para a otimização das coletas reduzindo-as a somente um gênero (Sanchez et al, 2008).

7. Biomarcadores avaliados no presente estudo

7.1. Fator de condição de Fulton (K)

Proposto por Bagenal e Tesch (1978), o fator de condição de Fulton (K) ($K = \text{Peso corporal} / \text{comprimento total}^3 \times 100$) representa o nível de resposta de um organismo no qual fatores como o *status* nutricional, efeitos de patógenos e

exposição a agentes químicos alteram o peso do animal, tanto sobrepeso quanto perda de peso. Dessa forma, esse índice reflete o *status* de saúde do animal e tem sido utilizado em vários estudos como método de monitoramento (Schimith e Dethloff, 2000, Lizama e Ambrosio, 2002). Contudo, estudos realizados em ambientes contaminados por metais como Cd, Cr e Zn não apresentaram diferenças em relação ao fator de condição de Fulton (de la Torre et al, 2005). Adicionalmente, esse índice pode variar devido à influência de vários fatores como o sexo dos animais, estação do ano, o local e espécie em estudo (Doyon et al, 1988; Griffiths e Kirkwood, 1995; Saborowski e Buchholz, 1996; Fisher et al, 1996). No entanto, poucos trabalhos na literatura consideram essas variações (Linde-Arias et al, 2008).

7.2. Biomarcadores histopatológicos

Histopatologias têm sido empregadas como possíveis biomarcadores de impacto ambiental em vários órgãos de teleósteos. (Sanchez et al,1997; Bernet et al, 1999; Alberto et al, 2005).

A hiperplasia lamelar, caracterizada pelo espessamento do epitélio das lamelas, está geralmente presente em brânquias de peixes expostos a metais e outros contaminantes como os bifenilos policlorados (PCBs) (Costa et al, 2009). O aumento da ocorrência dessa histopatologia também ocorre em animais expostos ao esgoto doméstico, que também representa uma fonte de liberação de metais no ambiente (Biagini et al, 2009). Adicionalmente, a hiperplasia lamelar apresenta-se como biomarcador sensível, uma vez que essa alteração ocorre

mesmo a baixas concentrações de metais no ambiente. Alterações circulatórias como aneurisma, edemas e presença de infiltrados inflamatórios também são comuns frente aos mesmos agentes estressores (Sanchez et al, 1997; Abdel-Moneim et al, 2012).

A fusão lamelar, caracterizada pela fusão de lamelas adjacentes por proliferação celular, pode estar relacionada com a alteração de parâmetros físico-químicos, principalmente a quantidade de oxigênio dissolvido disponível na água. Nesse caso, a fusão seria uma alternativa fisiológica para diminuir a superfície de contato do órgão com o ambiente e conseqüentemente minimizar os gastos energéticos com a regulação osmótica (Sollid et al, 2003; Nilsson e Renshaw, 2004; Sollid et al, 2005; Sollid et al, 2006;; Nilsson, 2007). Contudo, a fusão lamelar também pode estar relacionada com processos inflamatórios ou representar uma consequência da hiperplasia lamelar quando os animais estão expostos a ambientes contaminados por metais (Abdel-Moneim et al, 2012). Dessa forma, a utilização da fusão lamelar como bioindicador precisa estar com associada a análise dos tipos celulares que ocasionaram a fusão. Apesar de ampla descrição e utilização dessas patologias em estudos ambientais, poucas abordagens consideram a possível influência do sexo dos animais nas respostas aos estressores (Nero et al, 2006).

7.3. Biomarcadores imunológicos

O sistema imunológico compreende um conjunto de células capazes de rápida proliferação e diferenciação, é regulado por uma variedade de fatores solúveis,

encontra-se estreitamente integrado com vários órgãos, desempenhando assim diversas funções. Dessa forma, parâmetros imunológicos são influenciados por agentes externos como metais e outros poluentes, especialmente após exposição crônica. Essas características conferem alta sensibilidade a esses biomarcadores, ainda que em contrapartida apresentem baixa especificidade quanto ao agente estressor (Weeks et al, 1992).

Algumas enzimas envolvidas no processo inflamatório como a lisozima e celuroplasma apresentam aumento da atividade em animais provenientes de ambientes contaminados por metais como o Cd, Zn, Hg, Cr, e Fe e PCBs (Dautremepuits et al, 2009). Outros eventos imunológicos como a atividade fagocítica de macrófagos e granulócitos, dos centros melanomacrofágicos e síntese de muco, também apresentam suas atividades modificadas em ambientes contaminados por esses estressores (Bols et al, 2001; Hutchinson et al, 2003; van der Oost et al, 2003;; Akaishi et al, 2007; Dautremepuits et al, 2009; Ribeiro et al, 2011). Ainda assim em teleósteos a influência do gênero dos animais na atividade imunológica é pouco abordada (Aaltonen et al, 2000a; Aaltonen et al, 2000b). Entretanto, em mamíferos já se tem bem estabelecido que o gênero desempenha grande influência nas respostas imunológicas modulada por hormônios sexuais (Jansson, 1991; Zuckerman e Bryan, 1996; Liu et al, 2004).

7.3.1. Células *rodlets* e proteína S100

As células *rodlet* são identificadas pela presença de grânulos em forma de sacos que possuem produto de secreção com um núcleo elétron-denso

circundado por porções menos elétrons-densas. Possuem também uma cápsula espessa bastante evidente de origem fibrosa (Leino, 1974; Bielek, 2005). Essas células são observadas em vários tecidos de teleósteos, como brânquia, fígado, cérebro, rim, timo e intestino (Koponen e Myers, 2000; Mazon et al, 2007; Bielek, 2008; Siderits et al, 2009; Vigliano et al, 2009; Matisz et al, 2010).

Devido a sua localização generalizada, expressão de algumas proteínas como piscidina em seus grânulos e a alteração na ocorrência dessas células nos mais diversos tecidos de peixes provenientes de ambientes contaminados, sugere-se que essas células atuam nas respostas imunológicas do organismo. Entretanto a sua função ainda não está estabelecida na literatura (Reite, 2005; Mazon et al, 2007; Silphaduang et al, 2006; Vigliano et al, 2009).

Adicionalmente, foi mostrado que esses grânulos possuem expressão de hormônio estimulador de melanócitos (α -MSH) (Mazon et al, 2007). Em mamíferos o α -MSH é conhecido por suprimir a resposta inflamatória mediada por citocina através da indução da produção de IL-10 pelos monócitos (Sternberg, 2006). Em peixes, a atividade desse hormônio é pouco conhecida, entretanto em carpas foi mostrado que o α -MSH aumenta a atividade fagocitária de leucócitos (Tort, 2011). Esses dados mostram que essas células podem endocrinamente atuar sobre o sistema imunológico (Mazon et al, 2007).

A presença da proteína S100 também foi recentemente descrita na cápsula e grânulos das células *rodlets* em intestino de *Psetta maxima* (Vigliano et al, 2009). A proteína S100 pertence à família de proteínas ligadoras de cálcio e possuem estrutura similar a calmodulina e troponina C. Em mamíferos são descritos

diversos subtipos de S100 que desempenham as mais variadas funções (Donato et al, 2001). Entretanto, o subtipo S100A8/A9 merece destaque devido a sua presença em granulócitos polimorfonucleares. Estudos recentes apontam que a expressão dessa proteína está relacionada com a supressão do processo inflamatório (De Lorenzo et al, 2010; Sroussi et al, 2012). Apesar de em mamíferos as funções das proteínas S100 estejam bem estabelecidas, em teleósteos suas funções ainda não foram descritas.

Apesar de vários estudos em teleósteos relacionarem a célula *rodlet* ao processo inflamatório, ainda não foi esclarecida em qual fase essas células estariam atuando (Dezfuli et al, 2007). Entretanto, mesmo sem a elucidação da função dessas células, elas têm sido utilizadas em estudos em que animais estão expostos a fatores de estresse como metais, organoclorados e infecções parasitárias (Dezfuli et al, 2003; Manera e Dezfuli, 2004; Dezfuli et al, 2007; Poltronieri et al, 2009). Ainda assim, outros fatores podem interferir no comportamento dessas células, dentre eles o sexo dos animais como descrito por Jardanova e colaboradores (2007) em fígado de salmonídeos. Infelizmente, até o momento, nenhum trabalho mostra a influência do sexo na ocorrência de células *rodlet* em brânquias de animais provenientes de ambientes contaminados por metais.

7.3.2. Mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO)

Em mamíferos, a mieloperoxidase (MPO) é uma hemoproteína lisossomal liberada da ativação primária de grânulos azurófilos presentes em células inflamatórias, principalmente por neutrófilos, mas também presentes em eosinófilos (Faurichou e Borregaard, 2003). No entanto, em *zebrafish* (*Danio rerio*), a presença de MPO está restrita aos neutrófilos, em decorrência da expressão do gene *mpx* nessas células (Bennet et al, 2001; Lieschke et al, 2001; Balla et al, 2010). Outras espécies de teleósteos como carpa (*Labeo rohita*) e *Carassius auratus* também possuem a atividade dessa enzima relacionada aos neutrófilos (Katzenback e Belosevic, 2009; Mohanty e Sahoo, 2010). Adicionalmente, essa enzima está relacionada ao estresse oxidativo, convertendo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em hipocloreto (HOCl), sendo utilizada como biomarcador para diversas doenças humanas (Liu et al, 2004). Estudo epidemiológico realizado por Kabutomori (1999) mostrou que os níveis da enzima MPO em mulheres eram maiores que nos homens. Isso é decorrente de uma provável influência do estrógeno na regulação de genes envolvidos na síntese dessa enzima (Kabutomori et al, 1999; Reynolds et al, 2000).

Em mamíferos, a peroxidase eosinofílica está presente nos grânulos específicos de eosinófilos. Esses, em conjunto com outras células do sistema imunológico, estão envolvidos nas respostas imunes inatas relacionadas a infecções parasitárias (Anthony et al, 2010). Em teleósteos, a identificação de eosinófilos ainda é um tema bastante controverso, devido às variações morfológicas e ausência de marcadores específicos quando comparados aos mamíferos.

Morfologicamente semelhantes aos mamíferos e sem a presença de mieloperoxidase (MPO) nos grânulos (ausência da expressão do gene *mpx*), os eosinófilos foram inicialmente descritos em *zebrafish* por Lieschke (2001) e Bennett (2001). Porém, ainda não foi identificada uma peroxidase específica para os eosinófilos (EPO) em *zebrafish*, nem tampouco a existência de gene ortólogo (*epx*) nessas células (Lieschke et al, 2001; Balla et al, 2010; Bennett et al, 2001;). Entretanto, eosinófilos de *zebrafish* induzidos por peptídeos do helminto *H. polygyrus* apresentaram desgranulação e presença de peroxidase no sobrenadante (Balla et al, 2010). A atividade da peroxidase foi mensurada com sucesso por meio de ensaio de OPD, método bastante utilizado para medir a atividade da peroxidase após a desgranulação de eosinófilos em mamíferos (Adamko et al, 2004; Palic et al, 2005). Porém, as atividades dessas enzimas ainda não foram descritas como possível biomarcadores em peixes provenientes de ambientes aquáticos contaminados, bem como possível influência do sexo dos animais na atividade dessas enzimas.

7.3.3. Células mucosas

A produção de glicoproteínas pelo epitélio das brânquias, pele e sistema digestório constitui o primeiro mecanismo de defesa do organismo às infecções por patógenos. Além de representar uma barreira física, o muco contém vários fatores humorais e peptídeos anti-microbianos tais como lisozima, complemento e lectinas (Shephard, 1984; Bols et al, 2001; McGuckin et al, 2011).

Em brânquias de teleósteos, as células mucosas são classificadas de acordo com a composição das glicoproteínas. Células mucosas do tipo A são

encontradas principalmente no epitélio dos arcos branquiais e sintetizam glicoproteínas ácidas com grupos carboxilados/glicoproteínas ésteres sulfatados e também glicoproteínas com dióis vicinais oxidáveis ou glicogênio. As células mucosas do tipo B se encontram principalmente nos filamentos e lamelas brânquiais e sua composição glicoprotéica se caracteriza pela presença de glicoproteínas com dióis vicinais oxidáveis ou glicogênio. As células do tipo C, por sua vez, produzem somente glicoproteínas ácidas com grupos carboxilados/ésteres sulfatadas (Kumari et al, 2009). Entretanto, a nomenclatura utilizada para as células mucosas pode variar na literatura (Paulino et al, 2012).

Em teleósteos, as células mucosas apresentam freqüência, tamanho e composição do muco diferente em relação à espécie, o hábito alimentar e as condições do meio em que o animal se encontra (Gona, 1979). Alterações como hiperplasia e hipertrofia das células mucosas são observadas frequentemente quando os peixes são expostos a fatores de estresse tais como variação na salinidade, infecção por parasitas, contaminação por metais, derramamento de óleos e herbicidas (Roberts e Powell, 2003; Dezfuli et al, 2010; Giari et al, 2012; Paulino et al, 2012). No entanto, animais a expostos cronicamente à sedimentos contaminados por diversos metais, com destaque para o Cu e Pb, apresentaram degeneração das células mucosas (Costa et al, 2009).

Nesse contexto, sugere-se que essas células também possam ser utilizadas como ferramenta auxiliar para a avaliação da qualidade do meio aquático (Gona, 1979; Costa et al, 2009; Giari et al, 2012; Paulino et al, 2012). Ainda assim,

nenhum trabalho na literatura descreve a influência do sexo dos animais expostos a ambientes contaminados por metais na secreção de muco.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

Avaliar a relação entre as alterações morfológicas e bioquímicas de brânquias de *Prochilodus argenteus* frente aos dados ambientais visando a sua utilização como biomarcadores de impacto ambiental, considerando a influência do gênero dos animais capturados no rio São Francisco próximo a região da represa de Três Marias.

1.1. Objetivos específicos

- Caracterizar as condições ambientais nos diferentes pontos de estudo, através da determinação de parâmetros físico-químicos e quantificação de metais em água e sedimento.
- Caracterizar, por técnicas de microscopia de luz e eletrônica de transmissão, a disposição e composição celular das brânquias da espécie *Prochilodus argenteus*.
- Analisar a ocorrência de histopatologias no epitélio das brânquias de *P. argenteus* relacionando-as com as características ambientais e o sexo dos animais.
- Localizar, caracterizar e quantificar as células mucosas e *rodlet* através da utilização de diferentes técnicas histoquímicas, imunohistoquímicas e de microscopia eletrônica de transmissão.

- Determinar a localização citoquímica da enzima MPO e sua atividade enzimática, associando à atividade da EPO.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Local de estudo

Espécimes de *P. argenteus* foram coletados em dois diferentes pontos do rio São Francisco, a jusante da represa de Três Marias (S 18°12'51" O 45°15'51"). A coleta foi realizada durante a estação seca (agosto de 2008) com o intuito de evitar o período reprodutivo dos peixes. O primeiro local de amostragem situa-se imediatamente a jusante do reservatório da represa (JB) e o segundo local localiza-se após a confluência do rio Abaeté com o rio São Francisco à aproximadamente 34 km do primeiro ponto (JA) (Fig. 5). A coleta foi realizada com o auxílio dos funcionários da Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CODEVASF).

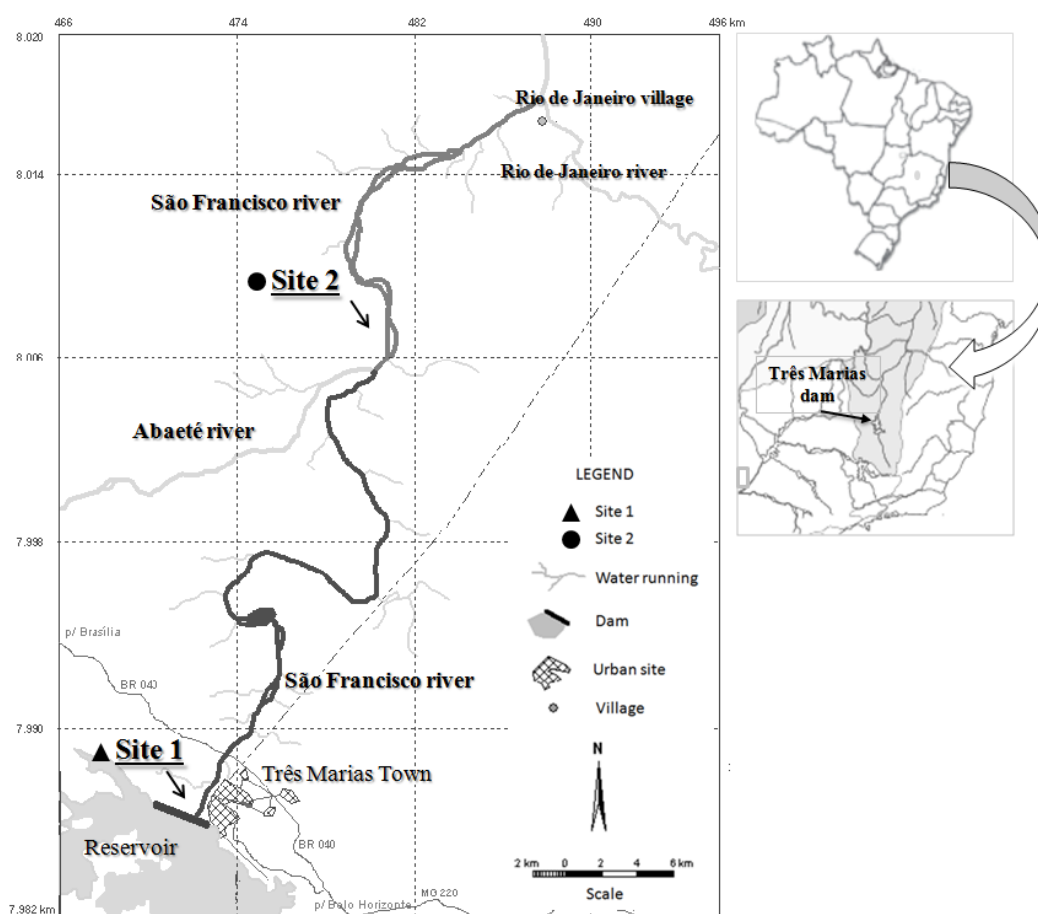


Figura 5. Locais de estudo no Rio São Francisco. O ponto de coleta 1 (JB) está localizado imediatamente a jusante da represa de Três Marias, enquanto que o ponto 2 (JA) após a confluência com o rio Abaeté (Adaptado de Ribeiro et al, 2011).

2. Caracterização física e química dos pontos de amostragem

As medidas de parâmetros físico-químicos da água e a determinação da concentração de metais em água e sedimento foram realizadas nos dois pontos de estudo (JB e JA). Em cada ponto, as medidas foram realizadas na margem direita, margem esquerda e no canal central do rio São Francisco. Os resultados obtidos foram analisados pela média das três medições realizadas nos diferentes segmentos do rio.

2.1. Medidas de parâmetros físico-químicos da água

Os valores da condutividade da água ($\mu\text{S}/\text{cm}$), oxigênio dissolvido (mg/l), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e turbidez (UNT) foram obtidos com o auxílio de uma sonda multiparâmetros Horiba U10 e disco de Secchi, fornecidos pela Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CODEVASF).

2.2. Determinação da concentração de metais dissolvidos em água

As amostras foram coletadas em frascos plásticos de 500 mL previamente descontaminados em solução de ácido nítrico (10%) por 48 h e mantidas refrigeradas até a análise. No laboratório as amostras foram filtradas através de filtro de membrana de $0,45\ \mu\text{m}$, sendo a porção líquida utilizada na determinação da concentração dos metais cádmio (Cd), manganês (Mn) e zinco (Zn). A análise foi realizada utilizando-se o equipamento de espectrometria de absorção atômica com forno de grafite HGA 900 (GF AAS) Perkin Elmer (Norwalk, CT, EUA) no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG. Os valores foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3. Avaliação de metais em sedimento

O sedimento foi coletado utilizando-se draga de Petersen e posteriormente 350g foram armazenados em frascos plásticos de 500 mL previamente descontaminados em solução de ácido nítrico (10%) por 48h e mantidas refrigeradas até a análise. As amostras de sedimento foram secas em estufas a 60°C por 24 horas. Após secagem, as amostras foram trituradas em almofariz de

cerâmica e peneiradas em peneira com abertura de 65 μm . Suspensões contendo 10mg da amostra peneirada foram digeridos com a utilização de HNO_3 e HCl P.A. e lidas no espectrofotômetro de absorção atômica, conforme descrito acima para As, Cd, Cu e Mn. Os valores obtidos foram expressos em mg.Kg^{-1} .

3. Coleta e biometria

Para as avaliações biológicas, foram coletados 42 espécimes de *P. argenteus*, sendo que 20 (10 fêmeas e 10 machos) foram capturados em JB e 22 (9 fêmeas e 13 machos) em JA. A coleta foi realizada com a autorização concedida pelo Instituto Estadual de Florestas de Minas Gerais (IEF/MG). Licença de pesca científica NR 130-10, Categoria D.

Os espécimes foram capturados com o auxílio de tarrafas e conservados em recipientes plásticos de 500L contendo água proveniente do rio, permanecendo sem alimentação até a eutanásia. Para cada animal coletado foram obtidos dados biométricos de comprimento total (CT), comprimento padrão (CP) e peso corporal (PC). O estado de saúde dos animais foi determinado pelo fator de condição de Fulton (K). O valor desse índice foi determinado de acordo com Nikolsky (1963), utilizando-se da seguinte fórmula: $(K=PC/CT^3 \times 100)$, onde: PC = Peso corporal (g) e CT = comprimento total (cm).

4. Processamento histológico das brânquias

4.1. Eutanásia e dissecação

Após a captura, os animais foram sacrificados via transecção cranial com tesoura cirúrgica. O opérculo foi removido e fragmentos do primeiro arco brânquial direito de cada animal foram submersos em diferentes fixadores para as análises histológicas, histoquímicas, imunohistoquímicas e ultraestruturais conforme descritos abaixo. Parte do tecido coletado foi mantido em gelo seco, conservado em freezer à -80 °C, para a realização das análises bioquímicas.

O protocolo utilizado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA - UFMG) sob número de protocolo 175/11.

4.2. Histologia

Fragmentos brânquiais de cada espécime foram fixados por imersão em líquido de Bouin. Após 24 horas, foram mantidos em etanol 70% até o procedimento de descalcificação realizado em solução de Pereny por 24 horas, de acordo com Bancroft & Gamble (2007). Os materiais foram então desidratados em séries crescentes de concentração de etanol (70%, 80%, 90%, 95%), orientados e emblocados em parafina (Paraplast®). Secções não seriadas de 5µm de espessura foram obtidas utilizando-se navalhas de aço em micrótomo MICRON® e colhidas em lâminas histológicas de vidro.

Para a realização das análises histológicas, cortes de 5 µm foram desparafinizados em três banhos de xilol (15 minutos em cada), posteriormente

hidratados em séries decrescentes de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e lavados em água (5 minutos cada banho). Posteriormente, foram corados pela técnica de rotina com Hematoxilina e Eosina (H&E) em que os cortes hidratados foram submersos em solução de Hematoxilina de Delafield durante 1 minuto, diferenciadas em água corrente por 10 minutos e posteriormente imersas em eosina por 30 minutos, seguido de lavagem em água. Após a desidratação as lâminas foram montadas utilizando-se Entellan[®] e lamínulas de vidro. Para análise morfológica e documentação microfotográfica utilizou-se o microscópio de luz *Olympus BX41* acoplado a câmera digital *Olympus Q Color 3*, no Laboratório de Biologia Estrutural e da Reprodução (Departamento de Morfologia, ICB-UFMG).

4.3. Caracterização morfológica das brânquias de *Prochilodus argenteus*

Cortes corados em H&E foram analisados em microscópio de luz *Olympus*[®] *BX 48* para a caracterização morfológica da brânquia de *P. argenteus*. Para cada animal coletado, secções longitudinais do primeiro arco brânquial direito foram selecionadas de acordo com a orientação dos filamentos. Três filamentos de cada secção foram analisados para a descrição dos padrões morfológicos normais e patológicos do tecido epitelial da brânquia de *P. argenteus*. A documentação microfotográfica foi realizada conforme descrito anteriormente (ver item 4.2).

5. Análise morfométrica das patologias do epitélio branquial

Para essa análise foram utilizados 10 machos e 8 fêmeas coletados em JB e 11 machos e 7 fêmeas provenientes de JA. Para cada animal, três filamentos em cortes longitudinais foram selecionados e analisados de 60 a 100 lamelas por animal, totalizando-se 2760 lamelas. As histopatologias mais frequentes entre os animais foram quantificadas utilizando-se o microscópio de luz *Olympus BX 48* em aumento de 400x, de acordo com os critérios previamente estabelecidos por Sanches et al (1997) e especificados abaixo:

- Edema lamelar: caracterizado pela separação das duas camadas de tecido epitelial ou pela separação do epitélio simples pavimentoso de revestimento dos prolongamentos das células de pilar, envolvendo pelo menos 50% do comprimento da lamela.
- Hiperplasia lamelar: caracterizada pelo espessamento de áreas do tecido epitelial compreendendo mais de 50% do comprimento da lamela.
- Fusão lamelar: caracterizada pela fusão de duas lamelas adjacentes, compreendendo mais de 50% do comprimento da lamela.
- Inflamação interlamelar: presença de um ou mais aglomerados (mais que 5 células) de células inflamatórias localizados entre as células de pilar e a camada mais externa do epitélio lamelar.

6. Quantificação da ocorrência de células *rodlet* em espaços interlamelares

Células rodlet foram quantificadas em cortes longitudinais do arco branquial corados em H&E. A presença de células *rodlet* foi assinalada apenas em seções contendo fusão lamelar e considerando-se células *rodlet* com cápsula filamentosa e grânulos bem evidentes. Foram analisados 22 animais, sendo 9 provenientes do ponto JB (4 machos e 5 fêmeas) e 13 do ponto JA (8 machos e 5 fêmeas). Para cada indivíduo analisado foram utilizados 100 espaços interlamelares, totalizando-se 2200 espaços interlamelares estudados. As análises foram realizadas no microscópio de luz *Olympus BX 48* utilizando-se objetiva de 40x.

7. Análise das células mucosas do epitélio branquial

Cortes de 5 μm do epitélio branquial foram submetidos aos métodos histoquímicos de Alcian Blue (pH 2,5), PAS e PAS AB (2,5), segundo Bancroft & Gamble (2007), com modificações descritas abaixo:

- **Histoquímica de Alcian Blue (AB)**

Cortes de 5 μm foram desparafinizados em três banhos de xilol (15 minutos cada), posteriormente hidratados em séries crescentes de concentração de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e lavados em água. Posteriormente, foram incubados em solução a 1% de Alcian Blue (pH 2,5) por 40 minutos, lavados em água destilada, desidratados rapidamente e montados com Entellan® (Merck).

- **Histoquímica de PAS**

Cortes de 5 μm foram desparafinizados e hidratados conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foram incubados em solução de ácido periódico (0,5%) durante 5 minutos, lavados em água destilada e colocados em na solução de Schiff por 30 minutos. Após essa etapa, os cortes foram lavados três vezes em solução de metabissulfito de sódio (0,5%) por 3 minutos e posteriormente lavados em água corrente por 30 minutos. Os cortes foram então desidratados e montados com Entellan® (Merck).

- **Histoquímica de PAS-AB 2,5**

Cortes de 5 μm foram desparafinizados e hidratados conforme descrito anteriormente. Posteriormente, foram corados em solução de Alcian Blue (1%) em pH 2,5 durante 40 minutos, lavados em água destilada e colocados em solução de ácido periódico (1%) por 10 minutos. Após essa etapa, os cortes foram incubados com o reagente de Schiff por 30 minutos, lavados em água, desidratados e posteriormente montados com Entellan® (Merck).

7.1. Avaliação da distribuição das células mucosas do tipo A, B e C e do muco presente no espaço interlamelar

Células mucosas do tipo A, B e C foram quantificadas nos filamentos e lamelas de 27 animais, sendo 16 em JB (sete fêmeas e nove machos) e 11 em já (oito fêmeas e três machos em microscópio Olympus BX 48 com objetiva de 40x e retículo *Olympus*® ax0069 com 81 intersecções.

Duas secções de tecido corado em PAS-AB 2,5 de cada animal foram selecionadas e analisadas com o auxílio do microscópio *Olympus BX 48* em um aumento final de 400x. A quantificação foi realizada em 15 campos da ocular reticulada em cada corte que detinham filamentos longitudinais e lamelas simétricas, totalizando 30 campos por animal (2430 pontos de intersecção por animal), totalizando 780 campos analisados (65610 pontos analisados). Os pontos de intersecção foram contados quando coincidiram com as células mucosas do tipo A, B e C, presentes nos filamentos e lamelas. Muco do tipo A, B, e C presentes nos espaços interlamelares obedeceram ao mesmo critério. Todos os pontos de intersecção presentes nos filamentos, lamelas e espaços sem tecido também foram quantificados.

8. Quantificação bioquímica de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO)

Para as análises descritas abaixo foram utilizados 34 animais, sendo 16 (7 fêmeas e 9 machos) coletados no trecho impactado JB e 18 (8 fêmeas e 10 machos) no ponto de referência JA.

8.1. Mieloperoxidase (MPO)

Amostras das brânquias (100mg) foram homogeneizadas com 1,9 mL de tampão (NaCl 0,1 M; Na₃PO₄ 0,02M e Na₂EDTA 0,015M) em pH 4,7 e centrifugado a 4 °C por 10 min a 10000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado e 1,5 mL de solução de NaCl 0,2% foi adicionada ao precipitado

remanescente e após 30 s foi adicionado mais 1,5 mL de solução gelada de NaCl 1,6% com glicose 5%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas 4 °C por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionado às amostras 1,9 mL de tampão (Na_3PO_4 0,05M e HETAB 0,5% p/v) em pH 5,4, 3 ciclos de homogeneização e congelamento com nitrogênio líquido foram realizados. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático. Assim, para esse ensaio foram adicionados 25 μL das amostras diluídas a uma placa de 96 poços em duplicata (cavidade branco: Na_3PO_4 0,05M e HETAB 0,5% p/v) e em seguida foi adicionado a cada poço 25 μL do substrato TMB (3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina) e incubado a 37°C. Após 5 minutos, foi adicionado 100 μL de H_2O_2 (0,002%) e incubado a 37°C durante 5 minutos. Para o bloqueio da reação, foram adicionados 100 μL de H_2SO_4 (1M) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro à 450 nm (*EMax, Molecular Devices*). Os resultados foram expressos pela média da absorbância relativa à 100mg de tecido.

8.2. Peroxidase eosinofílica (EPO)

Amostras das brânquias (100mg) foram homogeneizadas com 1,9 mL de PBS (5X) e centrifugadas a 4 °C por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi então desprezado e o pellet ressuspendido em 1,5 ml de solução contendo NaCl 0,2%, sendo adicionada ao precipitado remanescente após 30 s mais 1,5 mL de solução gelada contendo NaCl 1,6% com glicose 5%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas 4 °C por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e a

amostra foi ressuspensa com 1,9 ml de tampão (Na_3PO_4 0,05M e HETAB 0,5% p/v) em pH 5,4, homogeneizadas e congeladas em nitrogênio líquido por 3 vezes. As amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 minutos a 10.000 rpm e o sobrenadante foi coletado para o ensaio enzimático.

Para o ensaio enzimático foram adicionados 75 μL das amostras diluídas numa placa de 96 poços em duplicata (cavidade branco: PBS) e em seguida foi adicionado a cada poço 75 μl do substrato (1,5 mM de OPD em tampão Tris-HCl 0,075 mM em pH 8,0 acrescido de H_2O_2 6,6 mM). Após 30 minutos de incubação no escuro, a reação foi bloqueada com a adição de 50 μL de H_2SO_4 (1M) e a absorbância foi lida em espectrofotômetro à 492 nm (*EMax, Molecular Devices*). Os resultados foram expressos pela média da absorbância relativa à 100 mg de tecido.

9. Histoquímica de MPO

Para essa análise foram utilizados 29 animais sendo que 16 coletados em JB (9 machos e 8 fêmeas) e 13 em JA (5 machos e 8 fêmeas). Cortes de 5 μm foram desparafinizados em três banhos de xilol (15 minutos cada), posteriormente hidratados em séries decrescentes de concentração de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) e lavados em água. Posteriormente, foram incubados em solução de dicloreto de benzidina (0,0003%) em etanol (30%) durante 30 segundos e montados em glicose (Reagen[®]). O controle foi realizado pelo bloqueio da peroxidase com solução de H_2O_2 (30%) durante 30 minutos. A documentação fotográfica foi realizada utilizando-se o microscópio *Olympus BX41* acoplado a

uma câmara digital *Olympus Q Color* no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução.

10. Imunohistoquímica para S100

Secções de tecido branquial de 4 μm de espessura foram colocadas em lâminas histológicas de carga positiva (Amitel®), deparafinizados em três banhos de xilol (15 minutos cada) e posteriormente hidratados em séries crescentes de concentração de álcool (100%, 95%, 90%, 80%, 70%). Após essa etapa, os cortes foram lavados em PBS, pH 7,3, por 15 minutos e seguido por ativação antigênica em tampão citrato 10 mM, pH 6,0 em aquecimento em micro-ondas em potência alta durante 10 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram lavadas em PBS com 0,2% de *Tween 20* (Sigma®) e posteriormente lavadas em PBS (pH 7,3) durante 5 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado em PBS-BSA (albumina 2% em PBS). Após 30 minutos, os cortes foram incubados com o anticorpo primário goat anti S100 β chain (N-15) (Santa Cruz Biotechnology®) durante 12 horas. O anticorpo primário foi diluído em PBS-BSA (1%) na proporção de 1:300. Após essa fase, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena em solução com 30% H_2O_2 durante 15 minutos e posterior incubação com anticorpo secundário goat anti-rat (1:100) por 1 hora. Então, as lâminas foram lavadas em PBS com 0,2% de *Tween 20* (Sigma®), reveladas em 0,03% de DAB em PBS (pH 7,3). e contra-coradas em hematoxilina por 30 segundos, desidratadas em soluções de concentração crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 100%) e Xilol e posteriormente montados com Entellan (Merk®). A

documentação microfotográfica foi realizada utilizando-se o microscópio *Olympus BX41* acoplado a uma câmara digital *Olympus Q Color* no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Departamento de Morfologia, ICB-UFMG).

11. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Fragmentos das brânquias de *P. argenteus* foram fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) em tampão cacodilato de sódio (pH 7,4 e 0,1M), por 4 horas. Após fixação, os espécimes foram mantidos em tampão cacodilato de sódio (pH 7,4 e 0,1M), refrigerados a 6°C e acondicionados para o transporte em caixas de isopor com gelo triturado. O processamento do material foi realizado no Centro de Microscopia Eletrônica – CEMEL (Departamento de Morfologia, ICB/UFMG). As amostras foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em solução aquosa de tetróxido de ósmio (1%), durante 1 hora em câmara escura. Após 3 lavagens de 10 minutos cada no mesmo tampão cacodilato, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona Sigma® (50%, 70%, 95%, 100%), impregnados em solução de resina e acetona nas proporções de 2:1, 1:1 e 1:2 respectivamente, durante 2 horas cada. Após essa etapa, os tecidos foram infiltrados em resina pura overnight e posteriormente incluídos em resina Araldite EMBED 812®. Os blocos contendo os materiais foram obtidos após polimerização por 48 horas a 60 °C. Estes foram piramidados utilizando-se lâminas de aço sob lupa. Cortes semi-finos com 200 nm de espessura foram obtidos com a utilização de navalhas de vidro em ultra-micrótomo Sorvall MT-2B (*Dupont Instruments*, USA). Estes cortes semi-finos foram colhidos em lâminas histológicas e corados em solução de azul de toluidina 1% para posterior orientação dos cortes ultrafinos. Cortes ultrafinos com 80 nm de espessura foram obtidos no mesmo ultramicrótomo utilizando-se navalha de diamante Diatome® e colhidos em graticulas de níquel (300 mesh). Os cortes

foram contrastados em soluções aquosas de acetato de uranila 1% por 5 minutos no escuro, lavados com água destilada e submersos em solução de Reynold's contendo citrato de chumbo 2,5%. Os materiais foram analisados e fotografados no microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM10 a 80 kV. Após revelação, os negativos foram digitalizados no scanner Epson Perfection 4990[®].

12. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software *Graph Pad Prism*, versão 4.0. (San Diego, CA., USA). Os dados foram avaliados quanto a normalidade utilizando-se o método de Kolmogorov and Smirnov. Os dados paramétricos estão apresentados pela média \pm erro padrão da média (EPM) e os dados não paramétricos apresentados pela mediana. Os dados obtidos pela mensuração dos parâmetros físico-químicos da água e pela avaliação de metais pesados em água e sedimento foram analisados pelos teste t, seguido pelo teste F para análise da variação do desvio padrão. Os parâmetros que apresentaram variabilidade nos desvios padrões foram analisados pelo teste t com correção de Welch ($p < 0,05$). O fator de condição de Fulton foi analisado por ANOVA ($p < 0,05$). Por sua vez, os dados obtidos pela quantificação das histopatologias, com exceção dos focos de infiltrado inflamatório, foram analisados pelo teste não paramétrico de Fisher, enquanto os dados referentes às contagens de células rodlet foram analisadas pelo teste não paramétrico, Chi-quadrado, quando comparando os pontos de estudo e pelo teste de Fisher ao se comparar os gêneros nos pontos de estudo. Em ambos testes, $p < 0,05$ foi considerado significativo. .

A análise da quantificação dos focos de infiltrados inflamatórios, e da medição da atividade enzimática de MPO e EPO foram realizadas por teste t ($p < 0,05$) quando comparado somente os pontos de estudo e por ANOVA ($p < 0,05$) seguido do teste de Bonferroni ao se comparar os gêneros dos diferentes pontos de estudo. A correlação dos dados de MPO e EPO foi realizada pelo teste de

Spearman ($p < 0,05$). Contudo, os dados obtidos pela morfometria das células mucosas foram analisados pelo teste t ($p < 0,05$) e quando necessário aplicou-se a correção de Welch ($p < 0,05$). Além disso, visando a diminuição da variabilidade, alguns dados passaram pela transformação $-\log(y)$, seguido pelo teste t ($p < 0,05$).

RESULTADOS

1. Caracterização física e química dos pontos de amostragem

1.1. Medidas de parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água analisados tais como, condutividade, oxigênio dissolvido e pH apresentaram diferenças entre os pontos de estudo (JB e JA) , enquanto que a temperatura turbidez não apresentaram diferenças entre os dois pontos, conforme pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Valores correspondentes à condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$), taxa de oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$), turbidez (UNT) e pH obtidos nos dois pontos de estudo.

| Pontos | Condutividade | Oxigênio | Temperatura | Turbidez | pH |
|-----------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| JB | $21,5 \pm 6,70^*$ | $8,1 \pm 0,05^*$ | $22,9 \pm 0,06$ | $9,8 \pm 3,27$ | $6,2 \pm 0,06^*$ |
| JA | $5,6 \pm 0,17$ | $8,7 \pm 0,04$ | $23,3 \pm 0,25$ | $44,8 \pm 18,00$ | $6,6 \pm 0,08$ |

Valores apresentados por média \pm erro padrão. * $p < 0,05$.

1.2. Avaliação de metais dissolvidos em água

Conforme mostrado na tabela 4, as concentrações dos metais Cd, Mn e Zn dissolvidos apresentaram valores superiores no ponto imediatamente a jusante da represa de Três Marias (JB) quando comparado ao segundo ponto (JA).

Tabela 4. Concentração em $\mu\text{g.L}^{-1}$ de metais dissolvidos presentes na água coletada nos dois pontos de estudo.

| Pontos | Cd | Mn | Zn |
|-----------|----------------|-------------------|------------------|
| JB | 2,3 \pm 0,7* | 213,6 \pm 25,9* | 101,1 \pm 2,1* |
| JA | n.d. | 139,1 \pm 1,9 | 16,7 \pm 1,5 |

Valores apresentados por média \pm erro padrão. * $p < 0,05$; n.d.-não detectável.

1.3. Avaliação de metais pesados em sedimento

Metais como o As, Cd, Cu, Mn e Zn foram detectados em todas as amostras de sedimentos coletadas em ambos pontos de estudo. As concentrações obtidas para As e Cd no ponto JB apresentaram respectivamente valores 2,8 e 8,7 vezes maiores que os obtidos no ponto JA, conforme apresentado na tabela 5.

Tabela 5. Concentração em mg.Kg^{-1} de metais pesados presentes no sedimento coletado nos dois pontos de estudo.

| Pontos | As | Cd | Cu | Mn |
|-----------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| JB | 50,4 \pm 3,4* | 5,2 \pm 1,6* | 11,6 \pm 1,7 | 36,1 \pm 12,4 |
| JA | 18,2 \pm 1,2 | 0,6 \pm 0,3 | 5,6 \pm 0,3 | 45,0 \pm 8,8 |

Valores apresentados por média \pm erro padrão. * : $p < 0,05$.

2. Biometria

Os animais analisados apresentaram os valores médios \pm erro padrão para o comprimento total e peso corporal de $32,0 \pm 0,5$ cm e $471 \pm 19,3$ g respectivamente. Não houve diferença significativa dos pesos entre machos e fêmeas. Todos os animais apresentavam bom aspecto geral, não sendo observada nenhuma alteração em seu exame externo. .

2.1. Fator de Condição de Fulton (K)

O fator de condição de Fulton dos animais coletados nos dois pontos de apresentaram valores próximos a $1,4 \pm 0,16$. Não foram observadas diferenças, mesmo quando comparados os gêneros no mesmo ponto de estudo e em diferentes trechos conforme apresentado na figura 6.

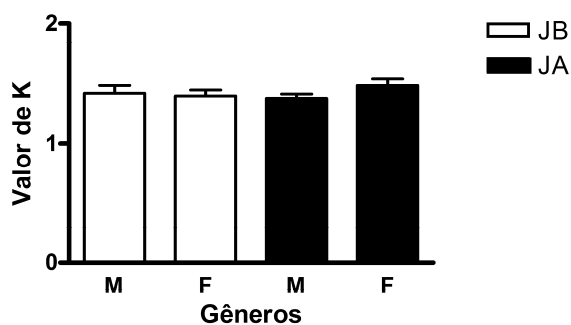


Figura 6. Gráfico contendo os valores do fator de condição de Fulton (K) dos animais dos diferentes sexos coletados em JB e JA. ($p < 0,05$). F: fêmeas, JA: ponto referência, JB: ponto impactado. M: machos.

3. Descrição histológica da brânquia de *Prochilodus argenteus* em condições normais

Os filamentos brânquiais possuem um eixo central do tecido cartilaginoso hialino, onde uma série de lamelas estão inseridas perpendicularmente, e separados uns dos outros por espaços interlamelares. Os filamentos são divididos em regiões proximal, média e distal. Na região proximal, onde o filamento se insere no arco branquial, são observadas internamente artérias aferentes próximas a músculo esquelético e tecido cartilaginoso hialino. O epitélio delimita os espaços lamelares e interlamelares (Fig. 7A). A região medial do filamento internamente é composta por tecido conjuntivo vascularizado com eventuais nódulos de cartilagem hialina que não invadem as lamelas (Fig. 7B). As lamelas estão dispostas perpendicularmente ao filamento formando os espaços interlamelares (Fig. 7B). Internamente, na região distal do filamento são observadas artérias de maior calibre, redução da área lamelar gradativamente substituída por uma camada epitelial estratificada mucípara (Fig. 7C). As lamelas são formadas por duas camadas epiteliais, separadas por várias células pilares, que delimitam os seios sanguíneos (Fig. 7D).

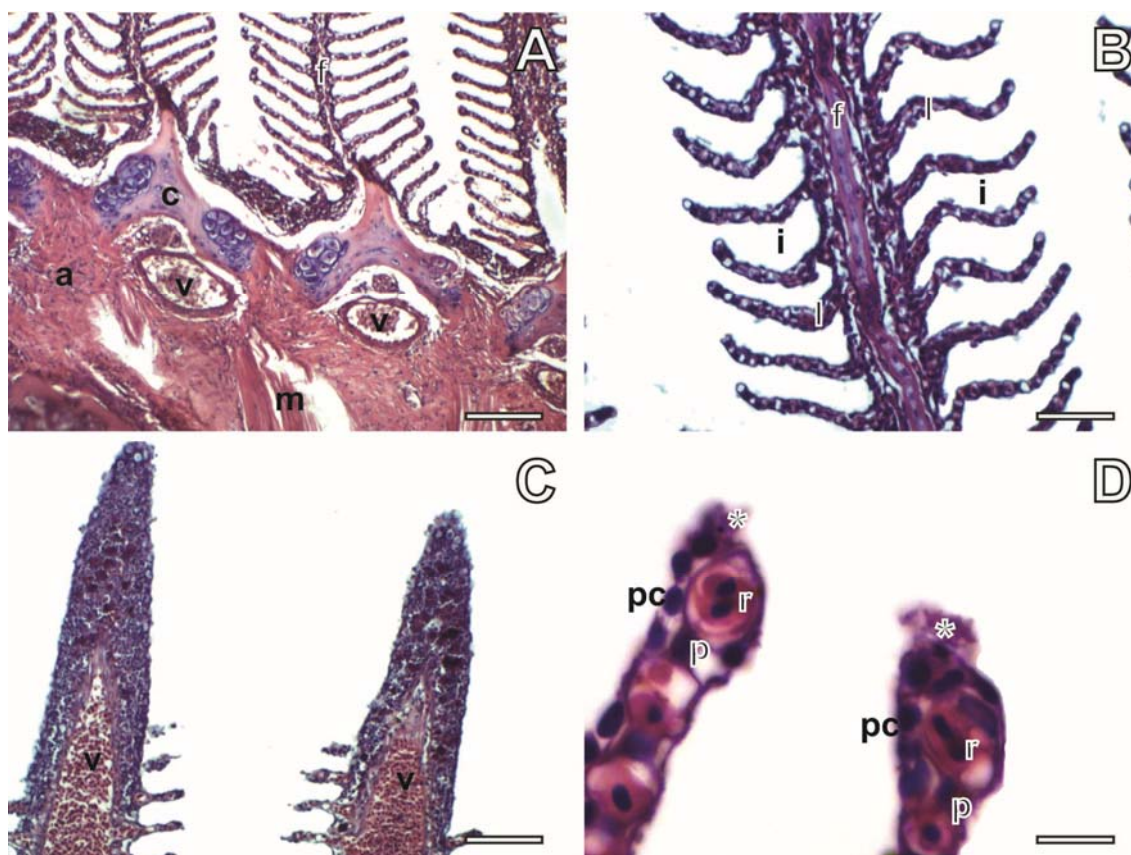


Figura 7. Micrografias de luz das brânquias de *P. argenteus*. **A:** Região do arco mostrando a região proximal dos filamentos inseridos no tecido de sustentação. **B:** Região medial de um filamento branquial composto de espaços interlamelares entre os conjuntos de lamelas. **C:** Face distal do filamento com os vasos sanguíneos e redução lamelar. **D:** Regiões distais de duas lamelas. Nota-se a presença de células pavimentosas, células pilares, células mucosas e eritrócitos. Coloração H & E. a: tecido de suporte do arco, c: cartilagem hialina, f: filamento, i: espaços interlamelares, l: lamelas, m: tecido muscular, p: células de pilar, pc: células pavimentosas, r: hemáceas, v: vasos sanguíneos, *: células mucosas. Barras A e C: 100 μm . Barra B: 50 μm . Barra D: 10 μm .

4. Descrição ultraestrutural do epitélio da brânquia de *Prochilodus argenteus* em condições normais

O epitélio branquial de *P. argenteus* é formado principalmente pelas células pavimentosas (CPVC), mucosas (CM), pilares (Pi), cloreto ou ricas em mitocôndrias (CRM) e as neuroepiteliais (CNE) (Fig. 8A e 8D). As PVCs encontradas nas lamelas apresentam formato alongado, um núcleo elíptico com presença de heterocromatina periférica, e nucléolo evidente (Fig. 8B). No citoplasma, observam-se poucas mitocôndrias aparelho de Golgi e cisternas de retículo endoplasmático (Fig. 8B e 8C).

As Pi delimitam o espaço vascular no interior das lamelas por meio das extensões de seu citoplasma que se unem pelas junções de membrana (Fig. 8A). Apresentam núcleo polimórfico com heterocromatina periférica e nucléolo evidente (Fig. 8A). O corpo celular da Pi apresenta formato cuboidal com quatro prolongamentos citoplasmáticos contendo poucas vesículas elétron-densas e mitocôndrias (Fig. 8B).

CM foram encontradas nos espaços interlamelares e nas lamelas apresentando variações na sua morfologia. As CM localizadas nas lamelas possuem formato e núcleo alongados e são caracterizadas pela grande quantidade de grânulos com diferentes elétron-densidades no citoplasma. Ainda, foram observadas poucas organelas no citoplasma, sendo identificadas mitocôndrias e algumas cisternas de retículo endoplasmático (Fig. 8A e 8B). No entanto, as CM imaturas (CMI) apresentam núcleo com heterocromatina periférica mais evidente e citoplasma com menor quantidade de grânulos elétron-densos quando

comparado às células maduras (Fig. 8A). Por sua vez, as CM localizadas entre as lamelas localizam-se preferencialmente na superfície e apresentam forma de cálice, (sendo denominadas células globets na literatura), núcleo indentado e presença de retículo endoplasmático liso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos (Fig. 9C).

As CRM são predominantemente localizadas entre as lamelas (Fig. 9A), entretanto também foi observada no epitélio da lamela (Fig. 9B). Apresentam núcleo irregular e é principalmente caracterizada pela abundância de mitocôndrias no citoplasma. Além disso, também apresentam aparelho de Golgi, cisternas do retículo endoplasmático rugoso e sistema vesico-tubular bastante desenvolvidos (Fig. 9A).

Por sua vez, as CNE localizam-se entre as lamelas e próximas à lâmina basal do epitélio, organizando-se em nichos. O núcleo possui formato irregular com a presença de heterocromatina periférica e nucléolo evidente. No citoplasma elétron-lucido é observada a presença de microtúbulos e vesículas com maior elétron-densidade periférica e conteúdo de elétron-densidade intermediária (Fig. 9D).

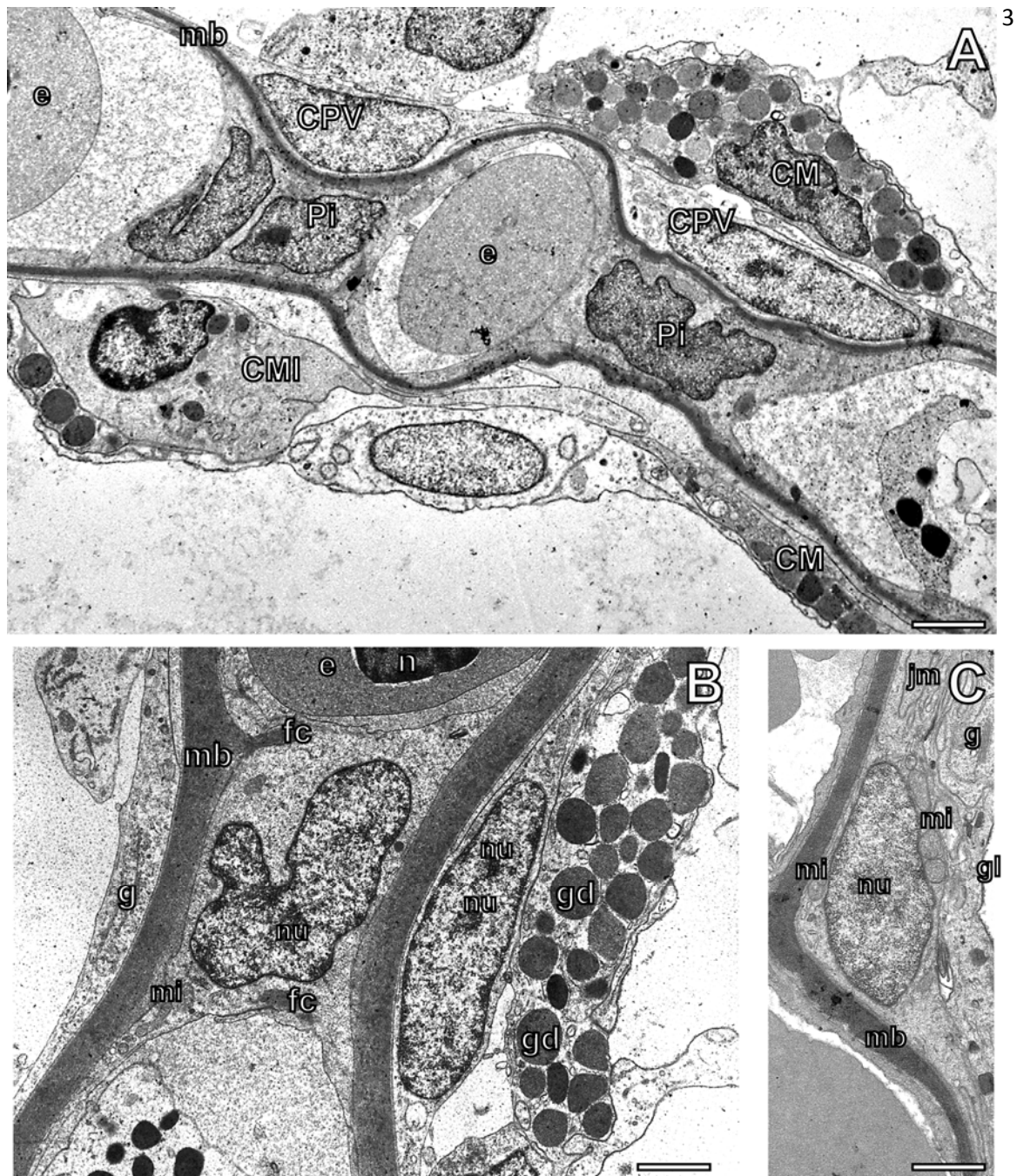


Figura 8. Eletromicrografia de transmissão das brânquias de *P. argenteus*. **A:** Lamelas mostrando células pavimentosas (CPV), células pilares (Pi), células mucosas (CM), glóbulos vermelhos, e uma membrana basal conspícua. **B:** Pis em detalhe mostrando um núcleo polimórfico, mitocôndrias e feixes de colágeno no citoplasma. A membrana plasmática das Pis delimitam sangue circulante. **C:** CPV sobre a membrana basal contendo núcleo alongado, mitocôndrias, e sistema tubular de vesículas e junções de membrana. CM: células mucosas, CMI: células mucosas imaturas, CPV: células pavimentosas, ce: alongamentos citoplasma, e: eritrócitos, ed: vesículas elétron-densas, fc: feixe de colágeno, g: complexo de Golgi, gd: grânulos elétron-densos, gl: glicocálix, jm: junções membranares, mb: membrana basal, mi: mitocôndrias, n: núcleos de eritrócitos, nu: nucléolo, Pi: células pilares, r: eritrócitos, v: sistema de vesículo- tubular. Barra A: 1,6 μ m. Barra B: 1,7 μ m. Barra C: 2,9 μ m.

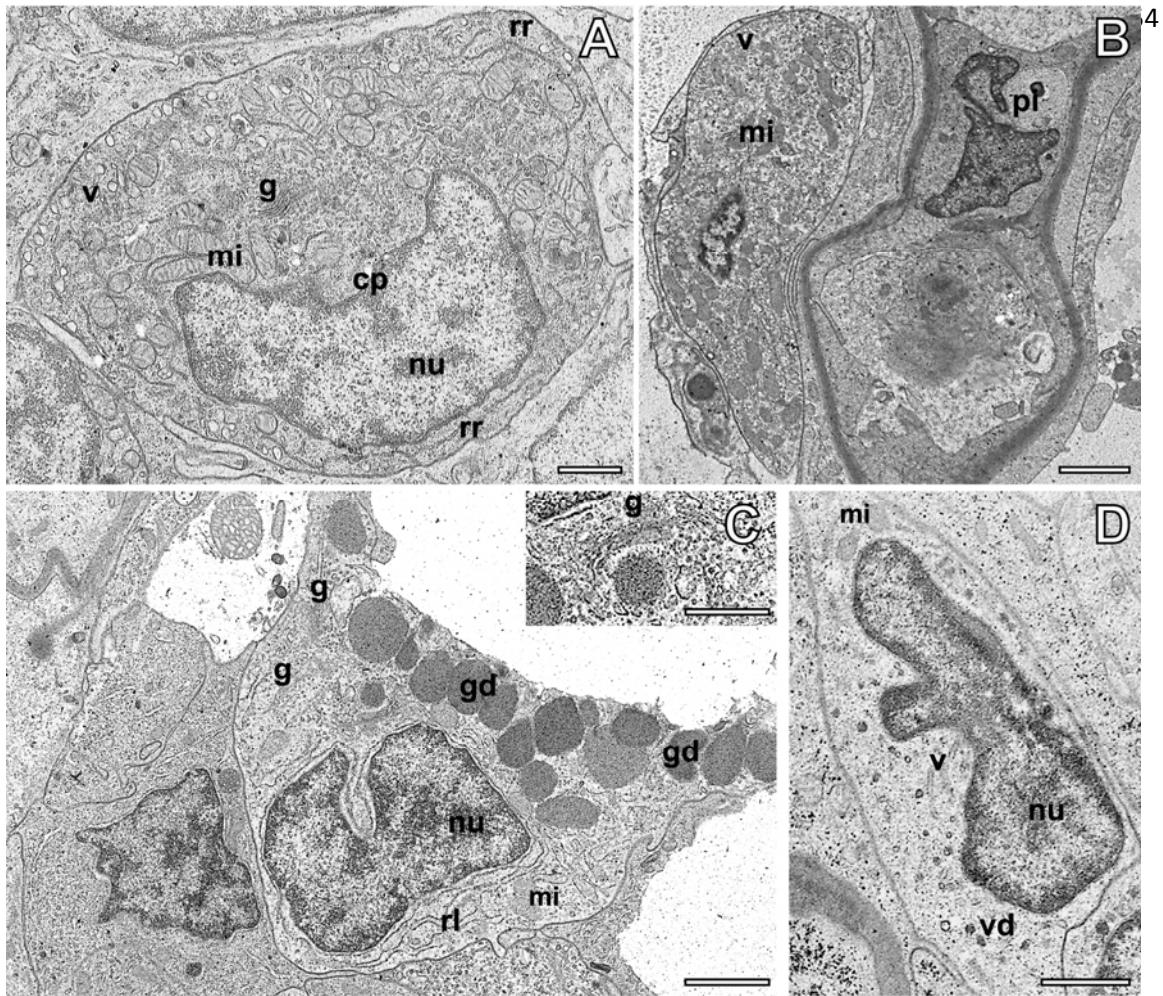


Figura 9. Micrografias eletrônicas de transmissão das células localizadas no filamento entre as lamelas de *P. argenteus*. **A:** Células cloreto clara (CRM), contendo várias mitocôndrias acompanhadas de complexo de Golgi e sistema tubular de vesículas bem desenvolvido. **B:** MRC escura apresenta mitocôndrias alongadas no citoplasma mais eletron-denso. **C:** Células mucosas (CM) com várias vesículas elétron-densas na face apical e cisternas do retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido. Em destaque um complexo de Golgi, barra: 1 μm . **D:** Célula neuroepitelial (CNE) apresentando citoplasma elétron-lúcido, contendo vesículas de periferia elétron-densa e conteúdo de densidade intermediária e sistema vesículo-tubular desenvolvido. cp; cromatina periférica, g: complexo de Golgi, gd: grânulos elétron-densos, mi: mitocôndrias, nu: nucléolo, pi: células pilares, rl: retículo endoplasmático liso, rr: retículo endoplasmático rugoso, v: sistema vesículo-tubular, vd: vesículas com periferia elétron-densa e conteúdo de densidade intermédia. Barras A e C: 1 μm . Barras B e D: 2 μm .

5. Alterações histopatológicas encontradas no epitélio branquial de *P. argenteus* coletados nos pontos de estudo

Alterações histopatológicas nas brânquias de *P. argenteus* foram observadas nos dois pontos de estudo e nos diferentes gêneros. As lamelas apresentaram fusão lamelar (Fig. 10A), hiperplasia lamelar (Fig. 10B), edema lamelar (Fig. 10C), focos inflamatórios (Fig. 10D), aneurismas (Fig. 10E), descolamento de epitélio (Fig. 10F). Cistos de parasitas também foram observados nos filamentos (Fig. 10G).

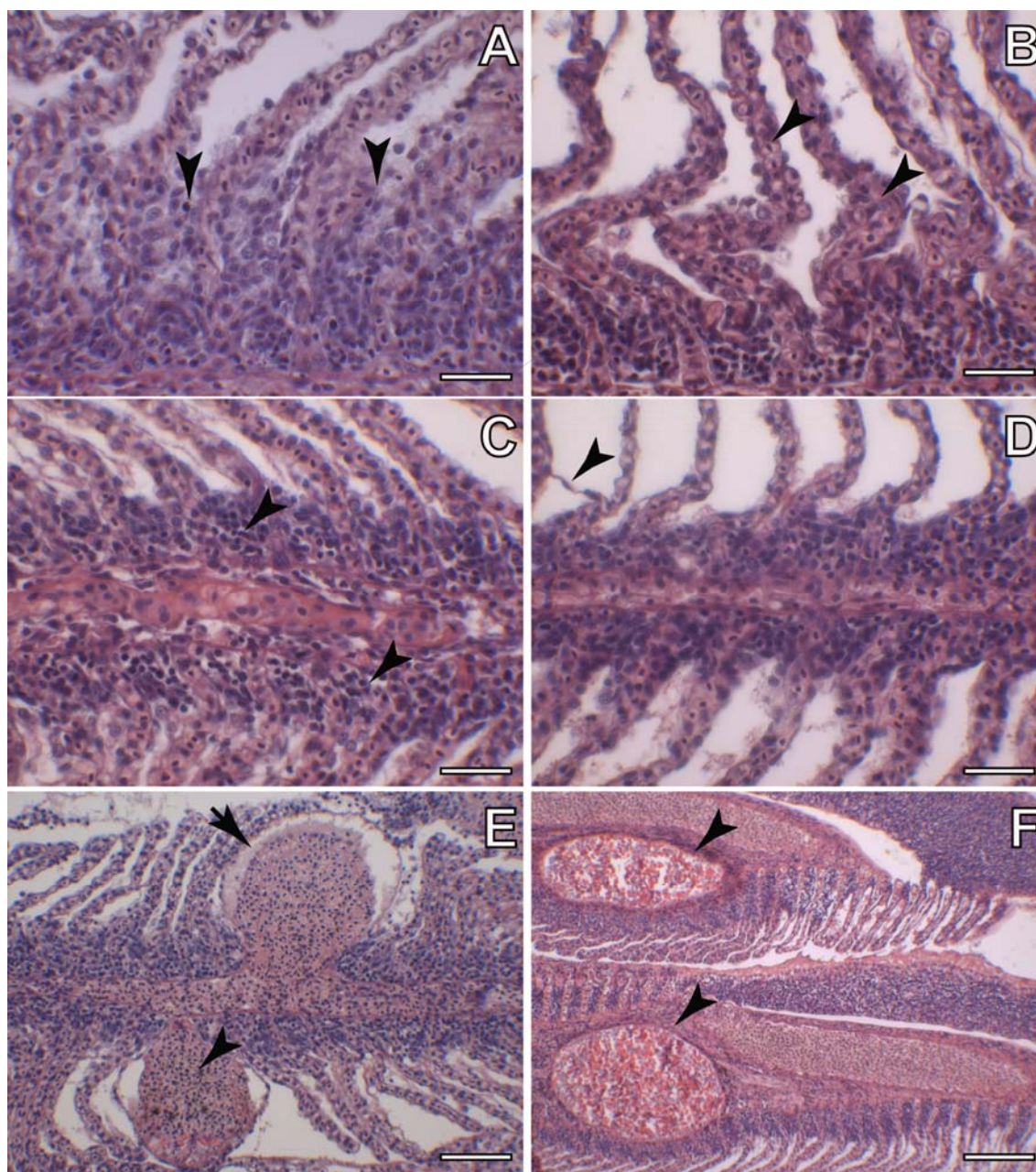


Figura 10. Alterações histopatológicas no epitélio branquial de *P. argenteus*. Em **A**, setas apontando a presença de fusão lamelar. Em **B**, observa-se a presença de lamelas hiperplásicas (seta). Em **C**, presença de focos de infiltrado inflamatório (seta). Em **D**, descolamento de epitélio evidenciado pela seta. Em **E**, lamelas com presença de aneurisma (cabeça de seta) e edema (seta). Em **F**, presença de cistos de parasitas (seta). Barra A, B, C, D: 30 μ m. Barra E: 60 μ m. Barra F: 130 μ m.

6. Análise morfométrica das alterações histopatológicas no epitélio branquial

As alterações histopatológicas encontradas com maior frequência (fusão lamelar, hiperplasia, edema e focos de infiltrado inflamatório), foram quantificadas nos diferentes pontos de estudo, separando-as por gênero. As alterações patológicas analisadas apresentaram comportamentos diferentes em relação ao trecho mais impactado (JB) e o trecho de referência (JA), bem como, em relação aos gêneros dos animais. Essas estão descritas abaixo em maior detalhamento.

6.1. Fusão lamelar

Animais do sexo masculino provenientes de JA apresentaram maior ocorrência de lamelas com a presença de fusão lamelar, enquanto não houve diferença significativa entre as fêmeas dos diferentes pontos (Fig. 11A e 11B). No trecho mais impactado do rio não houve diferença significativa entre machos e fêmeas enquanto no trecho de referência, os machos apresentaram maior fusão lamelar que as fêmeas (Fig. 11C e 11D).

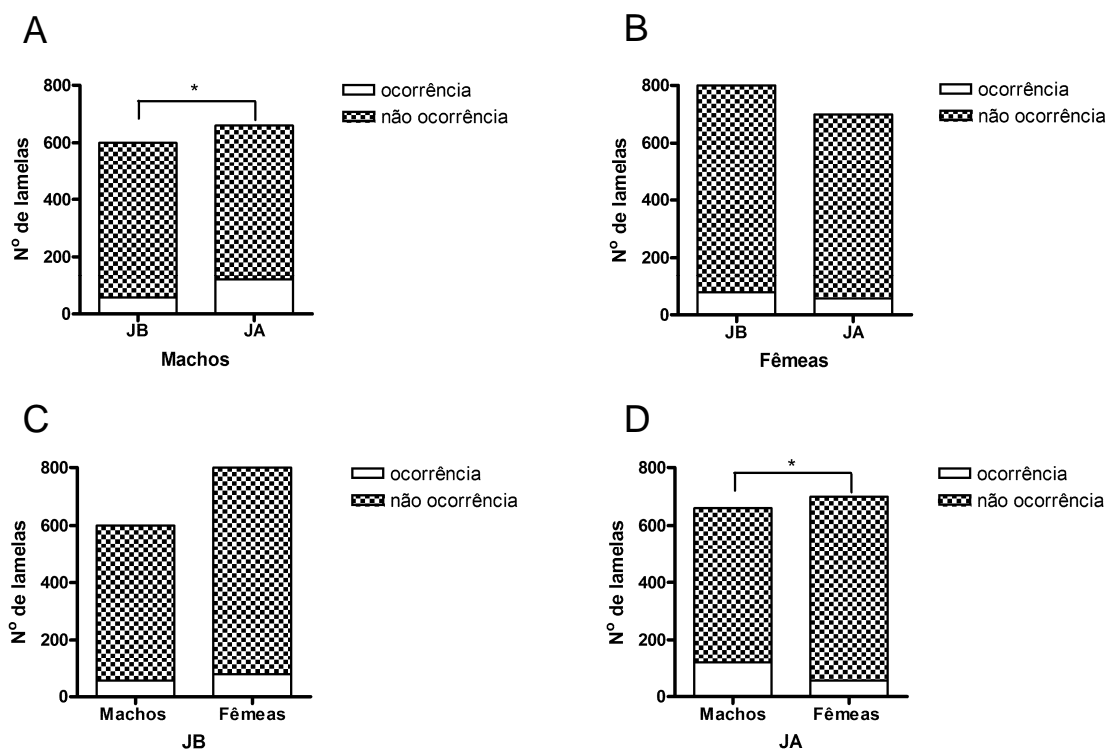


Figura 11. Gráficos contendo a ocorrência de lamelas fusionadas. Em **A**, notar a maior ocorrência de lamelas fusionadas em machos de JA e em **B**, a ocorrência em fêmeas nos diferentes pontos (JB e JA). Em **C**, observar a ocorrência de fusão lamelar em diferentes gêneros no ponto JB, e em **D**, a maior ocorrência em machos no ponto JA. JB: ponto impactado, JA: ponto referência, * $p < 0,0001$.

6.2. Hiperplasia lamelar

Animais dos dois gêneros provenientes de JB apresentaram maior ocorrência de lamelas hiperplásicas quando comparados com o ponto de referência (Fig. 12A e 12B). Entretanto, não houve diferença significativa entre os diferentes gêneros dentro de cada ponto de estudo (Fig. 12C e 12D).

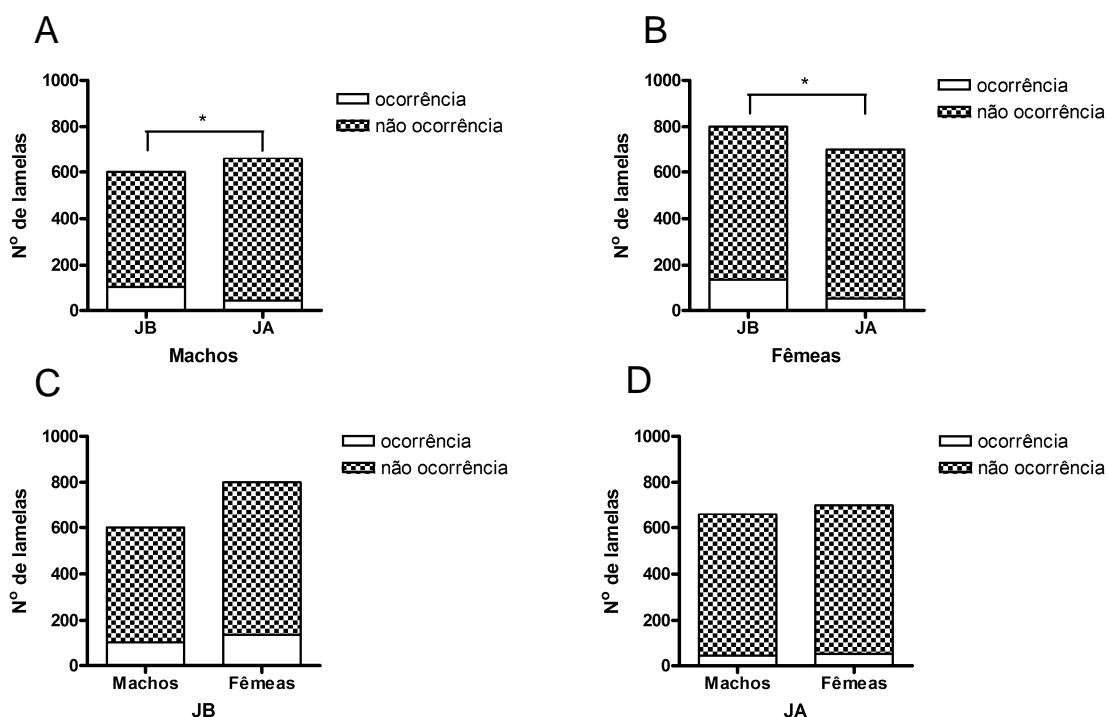


Figura 12. Gráficos contendo a ocorrência de lamelas que apresentaram hiperplasia. Em **A**, notar a maior ocorrência de hiperplasia lamelar em machos de JB, e em **B**, a maior ocorrência em fêmeas em JB. Em **C**, observar a ocorrência de lamelas hiperplásicas em diferentes gêneros no ponto JB, e em **D**, a ocorrência nos diferentes gêneros no ponto JA. JB: ponto impactado, JA: ponto referência, * $p < 0,0001$.

6.3. Edema lamelar

Animais do sexo masculino provenientes de JB e fêmeas provenientes de JA apresentaram maior ocorrência de lamelas com edemas lamelares (Fig. 13A e 13B). Conseqüentemente, dentro de cada trecho foi observado o mesmo comportamento (Fig. 13C e 13D).

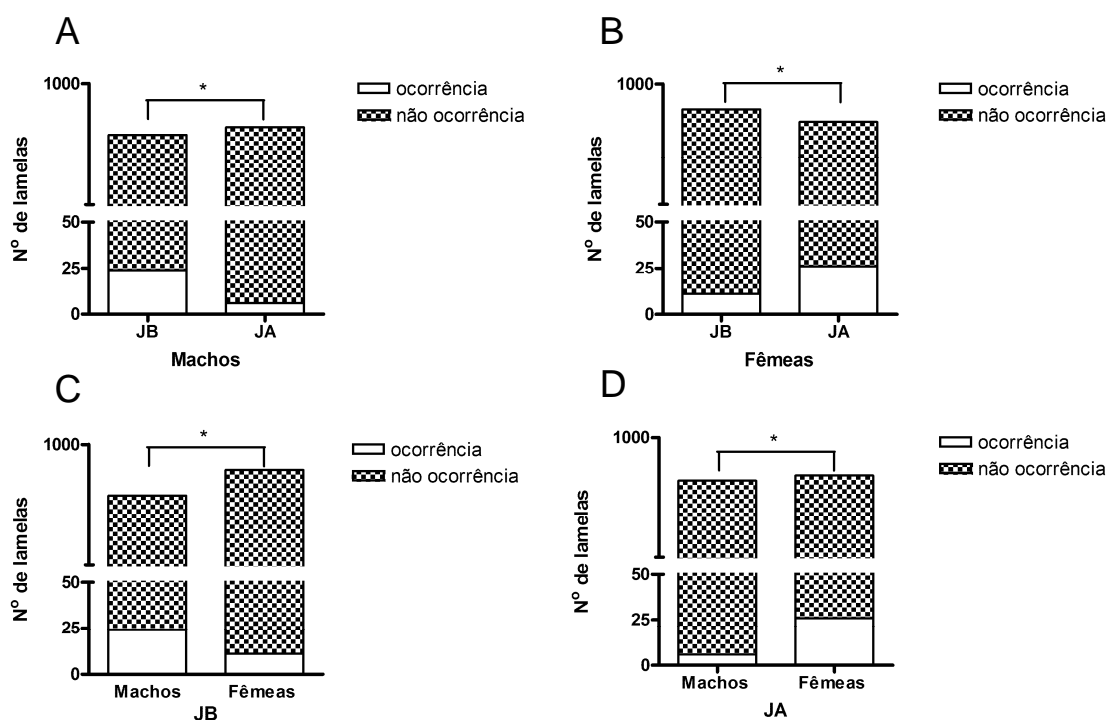


Figura 13. Gráficos contendo a ocorrência de edemas lamelares. Em **A**, notar a maior ocorrência de lamelas com edemas em machos de JB e em **B**, a maior ocorrência em fêmeas de JA. Em **C**, observar a maior ocorrência de edema lamelar em machos de JB, e em **D**, a maior ocorrência em fêmeas de JA. JA: ponto referência, JB: ponto impactado. , * $p < 0,01$.

6.4. Focos de infiltrado inflamatório

Peixes provenientes do ponto de referência (JA) apresentaram maior ocorrência de focos inflamatórios nos espaços interlamelares quando comparados com o trecho do rio impactado (JB) (Fig. 14A). Esse comportamento decorre da maior ocorrência de focos inflamatórios em fêmeas de JA (Fig. 14B).

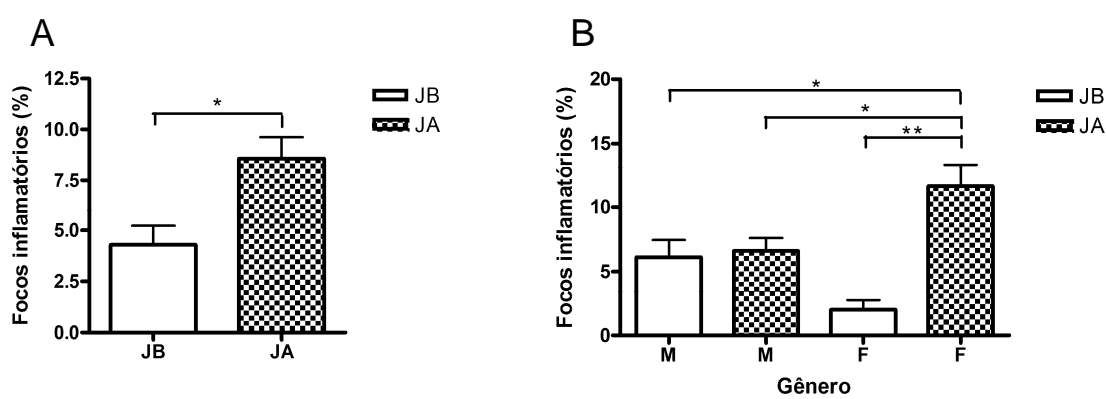


Figura 14. Gráficos mostrando a ocorrência de focos inflamatórios nos espaços interlamelares. Em **A**, maior ocorrência de focos inflamatórios no ponto JA e em **B**, entre animais de diferentes gêneros coletados nos dois pontos de estudo. F: fêmeas, JA: ponto referência, JB: ponto impactado. M: machos. Valores representados por média \pm EPM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,0001$.

7. Imunohistoquímica para S100 em células *rodlet*

As células *rodlet* que apresentaram imunomarcação para a proteína S100 foram observadas principalmente: no filamento entre as lamelas (Fig. 15A), abaixo da lâmina basal (Fig. 15B), em contato com a lâmina basal (Fig. 15C), dentro do seio da lamela (Fig. 15D), próximo aos vasos sanguíneos e inclusive dentro dos vasos (Fig. 15E) e na extremidade do filamento (Fig. 15F). Frequentemente, marcação foi observada no citoplasma e na cápsula. Ainda assim foram observadas células *rodlets* não marcadas para a proteína S100 (Fig. 15C e 15F).

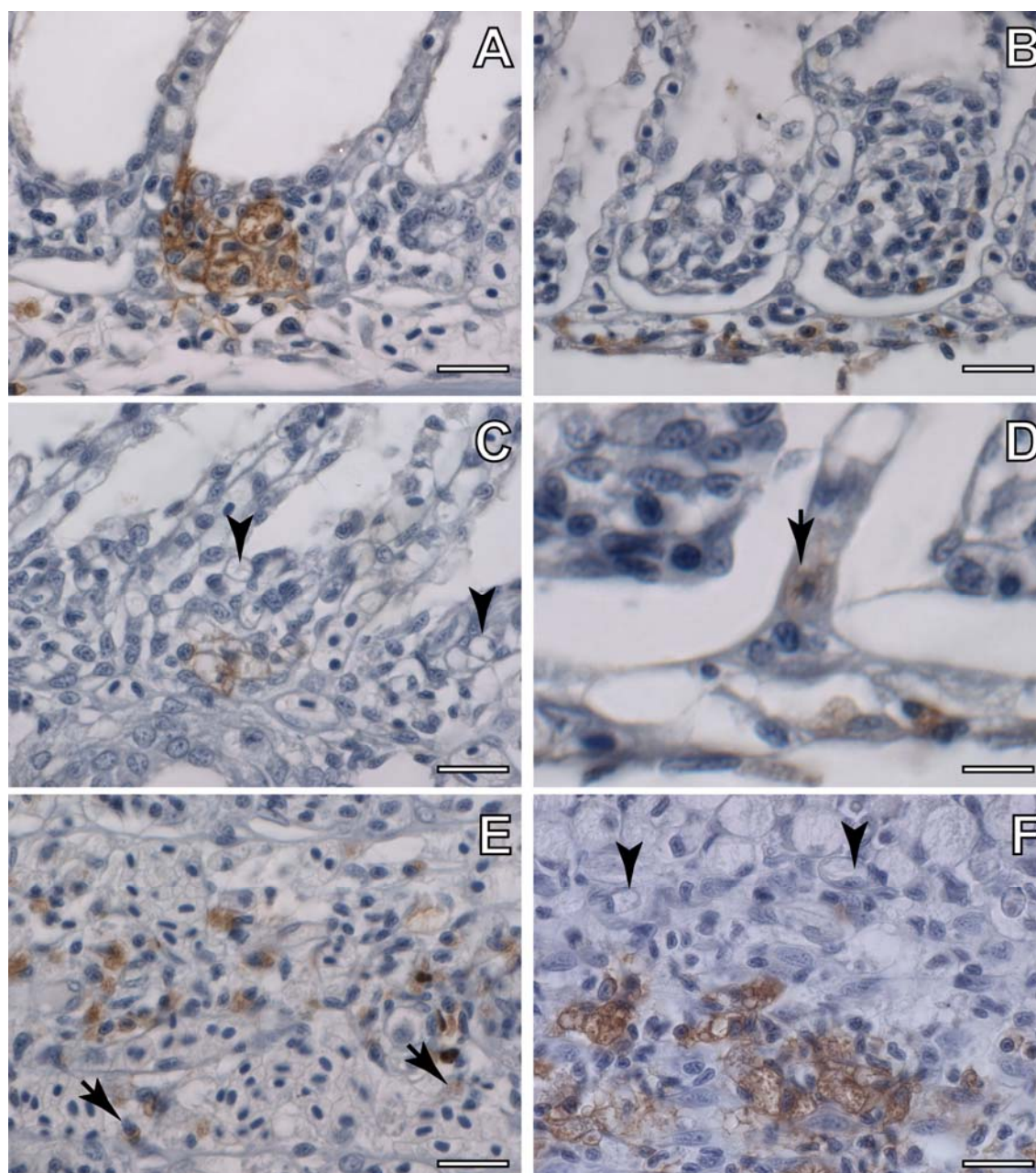


Figura 15. Micrografias de luz das brânquias de *P. argenteus* submetidas à imunohistoquímica para proteína S100 evidenciada em tons de marrons. Em **A**: Observar marcações na região do filamento entre as lamelas. **B**: Região do filamento apresentando marcação abaixo da lâmina basal. **C**: Presença de células marcadas para S100 em contato com a lâmina basal. **D**: Célula com marcação dentro do seio vascular da lamela, barra. **E**: Região interna do filamento com células marcadas dentro e fora dos vasos, barra. **F**: Extremidade do filamento apresentando nichos de células marcadas com S100. setas: marcações dentro de vasos sanguíneos, cabeça de seta: células rodlet que não apresentaram marcação para S100. Barra **A, B, C, E, F**: 10 μm . Barra **D**: 8 μm .

7.1. Caracterização das diferentes fases de maturação das células *rodlet* por microscopia eletrônica de transmissão

As células *rodlet* foram observadas em vários estádios de desenvolvimento no epitélio branquial de *P. argenteus*. As células jovens estão localizadas principalmente na região basal do filamento e apresentam cápsula mais delgada, poucos grânulos no citoplasma e predominância de eucromatina no núcleo. Além disso, observa-se que as células jovens apresentam formato circular e a maioria dos grânulos possuem somente o centro elétron-denso (Fig. 16A). As células de maturação intermediária já apresentaram espessamento da cápsula membranosa e aumento da quantidade de grânulos no citoplasma. Alguns grânulos, nesse estágio de desenvolvimento, apresentam substância de menor elétron-densidade ao redor do centro elétron-denso. Além disso, também observa-se a presença de vesículas em contato com a região interna da cápsula (Fig. 16B). No estágio avançado de desenvolvimento, as células rodlets localizam-se preferencialmente na superfície do epitélio estratificado do filamento, em contato com o meio externo. Possuem formato alongado, ocorrendo o deslocamento do núcleo para a região basal da célula (Fig. 16C). Ainda, a cápsula encontra-se muito desenvolvida e menos espessa apenas na região apical da célula que passa a conter grande concentração de mitocôndrias (Fig. 16D e 16E). Nos espaços interlamelares, células com características apoptóticas são encontradas próximas às células *rodlet* em desenvolvimento (Fig. 17A). Na figura 17B é observada a fusão de vesículas, contendo partículas de diferentes eletron densidades, com a cápsula (Fig. 17B).

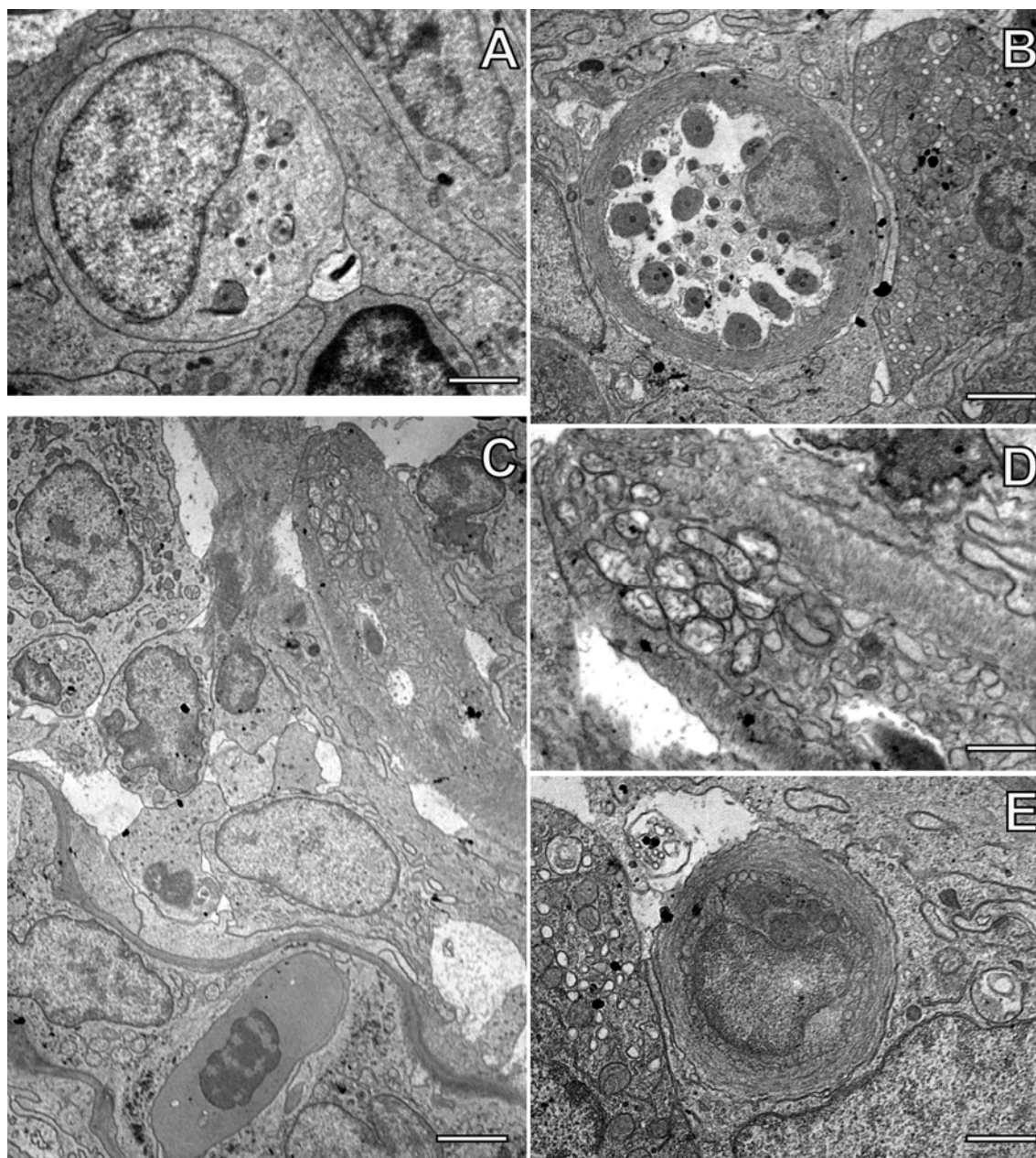


Figura 16. Eletromicrografias de células *rodlet* em diferentes estádios de desenvolvimento no epitélio branquial de *P. argenteus*. **A:** Célula *rodlet* jovem. **B:** Celula *rodlet* em estágio intermediário de desenvolvimento. **C:** Célula *rodlet* madura em corte longitudinal. **D:** Detalhe mostrando o acúmulo de mitocôndrias na região apical de uma célula *rodlet* madura. **E:** Célula *rodlet* em corte transversal após degranulação. Barra A e C: 0,5 μm . Barra B: 0,25 μm . Barra D e E: 0,15 μm .

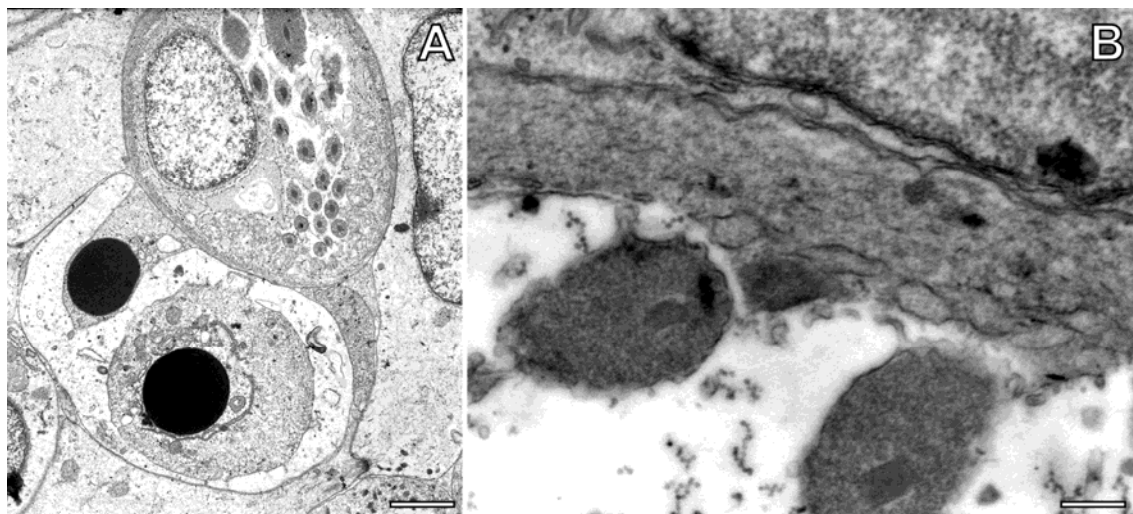


Figura 17. Eletromicrografias de células *rodlet*. Em **A** observa-se a associação das células *rodlets* com células em apoptose, e em **B**: a fusão dos grânulos com a cápsula da célula. Barras: 1,4 μ m e 0,05 μ m.

7.2. Quantificação da ocorrência de células *rodlet* em espaços interlamelares

Animais provenientes do ponto impactado (JB) apresentaram maior ocorrência de células *rodlets* nos espaços interlamelares quando comparados ao trecho de referência (JA) (Fig. 18A). Esse comportamento é resultante da maior ocorrência de células *rodlet* em espécimes machos de JB (Fig. 18B).

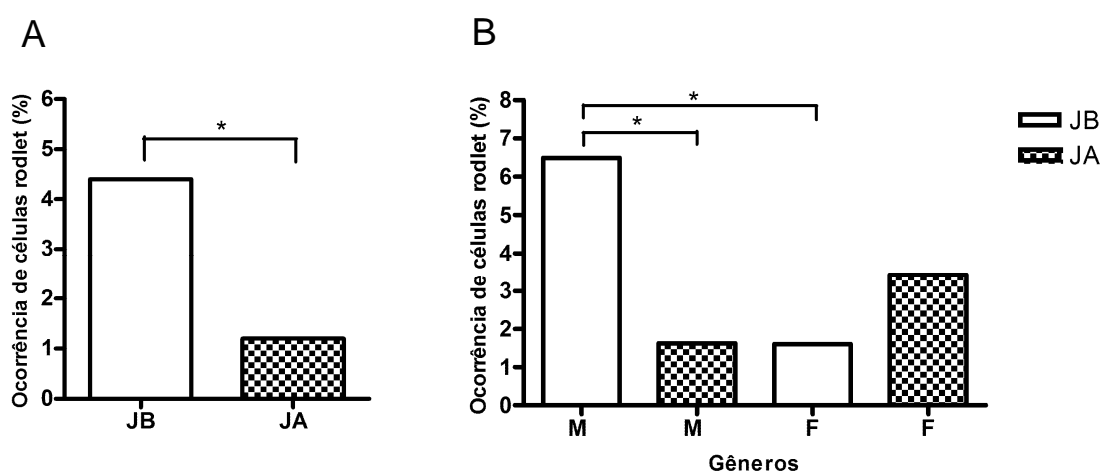


Figura 18. Gráfico contendo a porcentagem de espaços interlamelares com a presença de células rodlet. Em **A**, notar a maior ocorrência de rodlets em animais de JB e em **B**, entre os diferentes gêneros nos dois pontos de estudo. F: Fêmeas, JA: ponto referência, JB: ponto impactado, M: machos. Valores representados por mediana. * $p < 0,0001$.

8. Quantificação bioquímica de mieloperoxidase (MPO) e peroxidase eosinofílica (EPO)

8.1. Mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase apresentou-se mais elevada em animais provenientes do ponto de referência (JA) devido aos maiores valores de absorvância obtidos (Fig. 19A). Este resultado decorre provavelmente dos baixos valores de absorvância obtidos em machos provenientes do ponto JB (Fig. 19B).

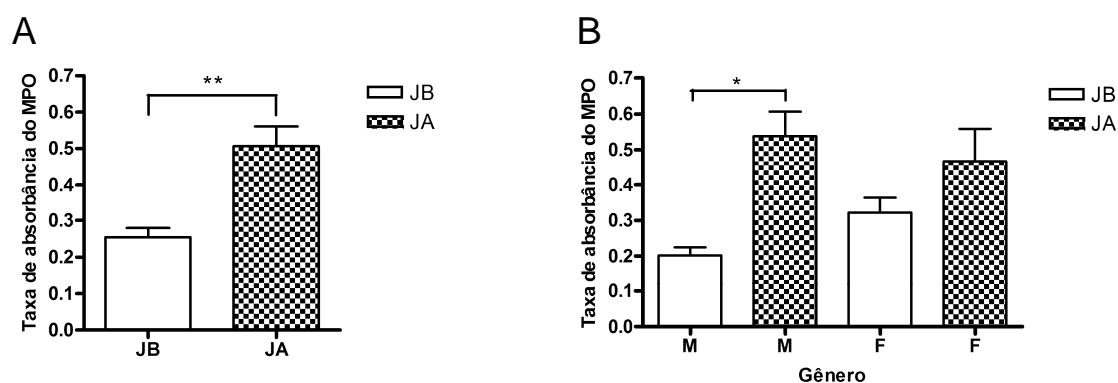


Figura 19. Gráficos contendo a taxa de absorvância de MPO em brânquias de animais dos diferentes gêneros coletados nos dois pontos de estudo. Em **A**, observar maior taxa de absorvância de MPO no trecho JA, e em **B**, considerando os gêneros nos diferentes pontos. F: fêmeas, JA: ponto referência, JB: ponto impactado, M: machos. Valores representados por média ± EPM. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,0001$.

8.2. Peroxidase eosinofílica (EPO)

A atividade da peroxidase eosinofílica apresentou o mesmo comportamento observado para MPO, apresentando atividade mais elevada em animais provenientes do ponto de referência (JA) (Fig. 20A). De forma similar, esse comportamento possivelmente decorre da menor atividade da enzima em espécimes machos de JB (Fig. 20B).

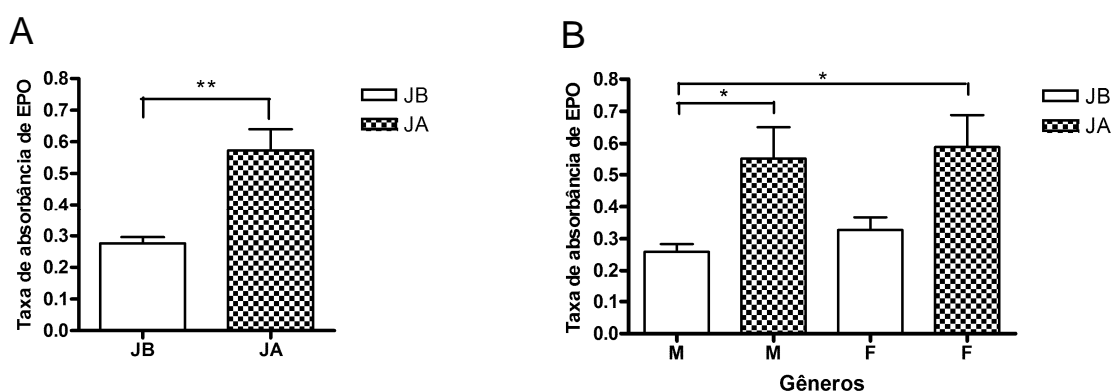


Figura 20. Gráficos contendo a taxa de absorvância de EPO em brânquias de animais dos diferentes gêneros coletados nos dois pontos de estudo. Em **A**, observar a maior taxa de absorvância de EPO em JA, e em **B**, considerando os gêneros nos diferentes pontos. F: fêmeas, JA: ponto referência, JB: ponto impactado, M: machos. Valores representados por média \pm EPM. * $p < 0,01$ e ** $p < 0,0001$.

Animais do trecho JB apresentaram correlação positiva moderada e linear entre a atividade da MPO e EPO (Fig. 21A). O valor da correlação para machos e fêmeas ($r = 0,5$) foi inferior ao obtido quando foram analisadas apenas fêmeas do mesmo ponto de coleta ($r = 0,7$) (Fig. 21B). Não foi observada correlação significativa entre os valores de absorvância de MPO e EPO de machos do ponto JB e entre os diferentes gêneros em JA.

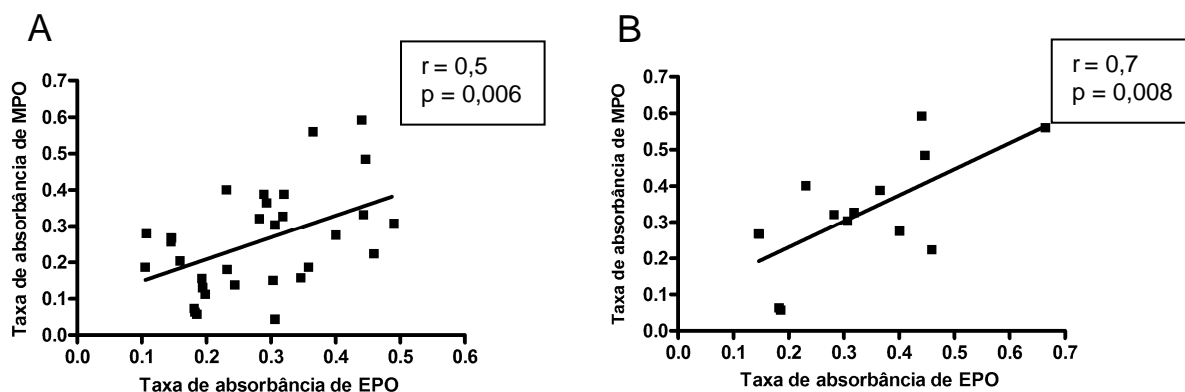


Figura 21. Gráficos mostrando correlação linear positiva entre a taxa de absorbância de MPO e a de EPO. Em **A**, correlação observada no trecho JB e em **B**, em fêmeas coletadas em JB. r: coeficiente de correlação.

9. Histoquímica de MPO

A marcação para MPO não foi homoganeamente distribuída nas brânquias. A atividade da enzima localizou-se principalmente abaixo da lâmina basal (Fig. 22A), ao longo do filamento (Fig. 22B), no vaso lamelar (Fig. 22C), em aneurismas (Fig. 22D) e em granulomas (Fig. 22E e 22F). A distribuição de frequência dessas localizações de acordo com *scores* (0-6) indica que espécimes machos do trecho JB apresentaram maior ocorrência de marcação de MPO associado a região abaixo da lâmina basal (Fig. 23A), às lamelas (Fig. 23C) e aos granulomas (Fig. 23D), enquanto os machos de JA apresentaram maior ocorrência de marcação nos filamentos (Fig. 23B). As marcações em regiões de aneurisma apresentaram maior ocorrência em JA (Fig. 23E).

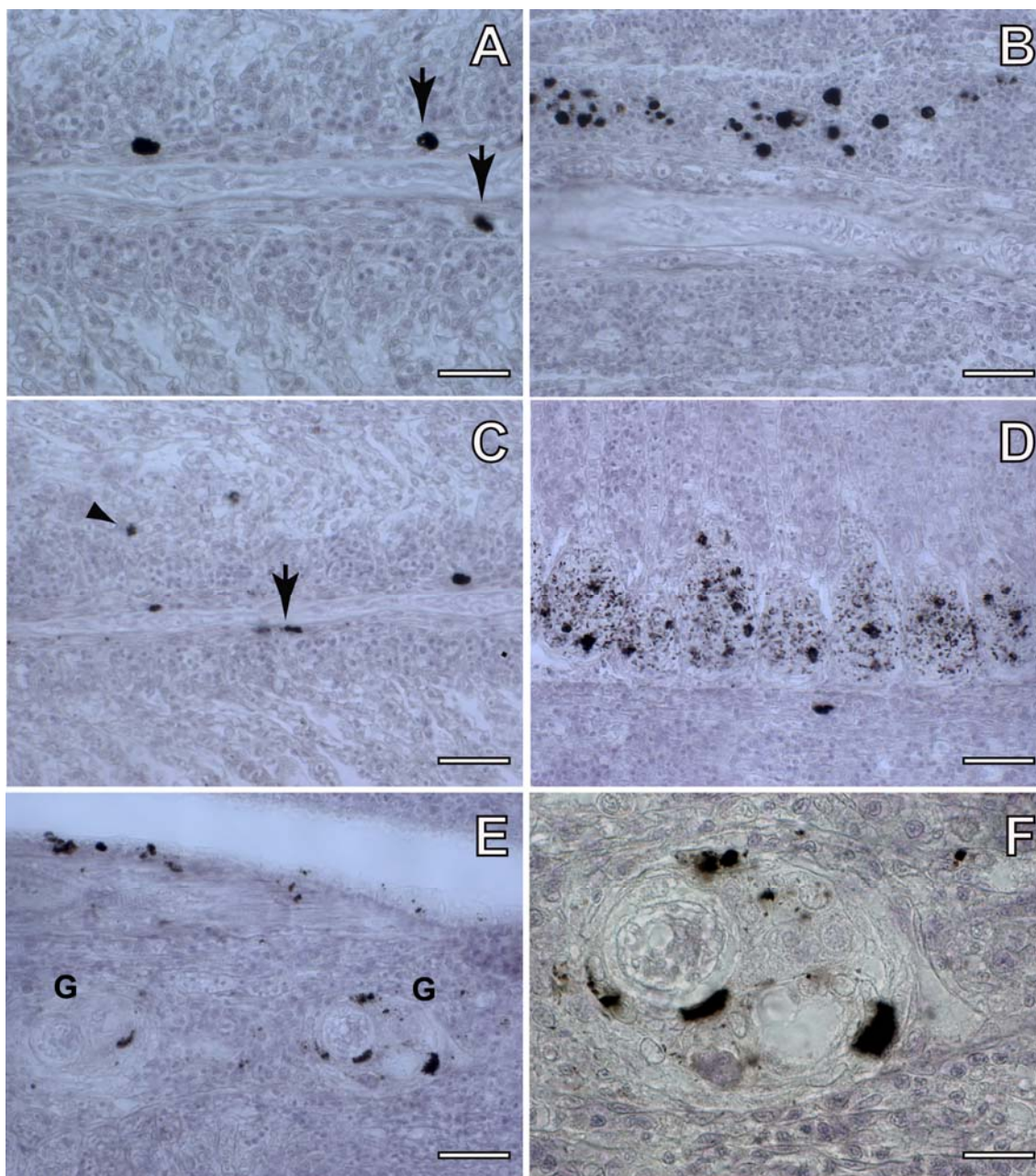


Figura 22. Micrografias de luz das brânquias de *P. argenteus* apresentando marcação em negro para MPO. **A:** Região do filamento abaixo da lâmina basal. **B:** Região do filamento marcada para MPO acima da lâmina basal entre as lamelas. **C:** Células positivas para MPO dentro do seio da lamela e abaixo da lâmina basal. **D:** Lamelas contendo aneurismas marcados positivamente para MPO. **E e F:** Granulomas com células marcadas para MPO. cabeça de seta: marcação dentro da lamela, g: granuloma, setas: marcações abaixo da lamela basal. Barra A: 20 μm . Barras B, C, D, E: 30 μm . Barra F: 10 μm .

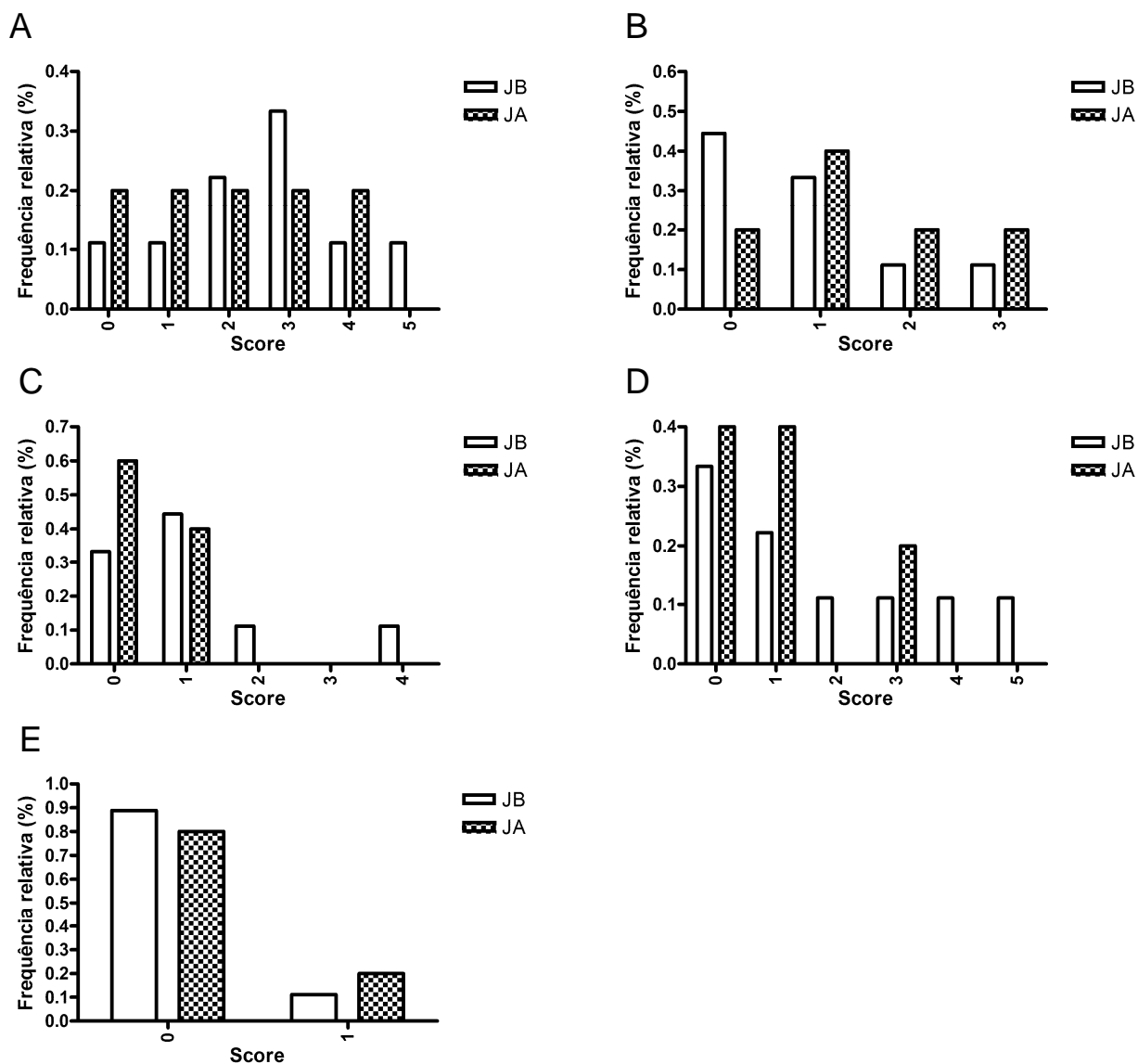


Figura 23. Gráficos mostrando a distribuição de frequência de estruturas marcadas pela histoquímica para MPO em espécimes machos. Em **A**, frequência observada na região abaixo da lâmina basal em JB e em JA. Em **B**, frequência observada no filamento em JB e em JA. Em **C**, frequência observada na região abaixo da lamela em JB e em JA. Em **D**, frequência observada em granulomas em JB e em JA em em **E**, frequência observada em aneurismas nos dois pontos de estudo. 0-6: scores de ocorrência das estruturas com presença de MPO. 0: ausência de estrutura marcada e 6: máxima ocorrência de estruturas marcadas.

10. Avaliação da distribuição das células mucosas do tipo A, B e C e do muco presente no espaço interlamelar

Os animais coletados no trecho impactado (JB) apresentaram diminuição próxima a 2 vezes do volume do filamento ocupado por células mucosas do tipo A, e cerca de 3 vezes nos espaços interlamelares ocupados por muco do tipo A (Tab. 6). Essa diminuição de volume do filamento ocupado pelas células mucosas do tipo A ocorreu nos espécimes machos (Tab. 7), enquanto a diminuição do volume ocupado por muco do tipo A nos espaços interlamelares foi evidenciado nas fêmeas (Tab. 8).

Entretanto, no trecho JB, os animais machos apresentaram aumento do volume das lamelas ocupado por células mucosas do tipo C (Tab. 7), tendência similar a das fêmeas do mesmo trecho (Tab. 6). Os machos de JB também apresentaram tendência no aumento de volume do filamento ocupado pelas células do tipo C (Tab. 5), a qual não observada nas fêmeas do mesmo ponto (Tab. 8). Além disso, os machos de JB também apresentaram um aumento do volume dos espaços interlamelares ocupado por muco do tipo B (Tab. 7).

Tabela 6. Volume ocupado pelos diferentes tipos de muco nas diferentes regiões da brânquia entre os pontos de estudo.

| Ponto | Tipo A (%) | | Tipo B (%) | | Tipo C (%) | |
|----------------------------|------------------------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| | JB | JA | JB | JA | JB | JA |
| Filamento | 3,7 ± 0,5 ^a | 6,2 ± 0,7 | 4,0 ± 0,5 | 4,0 ± 0,6 | 0,4 ± 0,2 | 0,1 ± 0,1 |
| Lamela | 1,6 ± 0,3 | 1,7 ± 0,3 | 3,3 ± 0,6 | 2,4 ± 0,6 | 0,4 ± 0,1 | 0,3 ± 0,1 |
| Espaço interlamelar | 6,2 ± 1,0 ^a | 19,3 ± 5,0 | 6,2 ± 1,0 | 11,2 ± 2,0 | 0,4 ± 0,2 | 0,7 ± 0,3 |

Valores representados pelas médias ± EPM. a: valores significativos entre os pontos de estudo ($p < 0,05$). JB: imediatamente abaixo da represa de Três Marias e JA: rio São Francisco após confluência com o rio Abaeté.

Tabela 7. Volume ocupado pelos diferentes tipos de muco nas diferentes regiões das brânquias de machos coletados nos dois pontos de estudo.

| Ponto | Tipo A (%) | | Tipo B (%) | | Tipo C (%) | |
|----------------------------|------------------------|------------|-------------------------|-----------|------------------------|------------|
| | JB | JA | JB | JA | JB | JA |
| Filamento | 3,8 ± 0,7 ^a | 8,0 ± 1,8 | 4,0 ± 0,5 | 5,0 ± 0,6 | 0,5 ± 0,2* | 0,1 ± 0,01 |
| Lamela | 1,6 ± 0,5 | 1,5 ± 0,6 | 2,3 ± 0,7 | 1,3 ± 0,6 | 0,5 ± 0,2 ^a | 0,1 ± 0,01 |
| Espaço interlamelar | 9,5 ± 3,2 | 19,6 ± 9,4 | 11,5 ± 1,5 ^a | 4,2 ± 0,4 | 0,5 ± 0,3 | 0,9 ± 0,9 |

Valores representados pelas médias ± EPM. a: valores significativos entre os pontos de estudo. *: $p = 0,07$. JB: imediatamente abaixo da represa de Três Marias e JA: Rio São Francisco após confluência com o rio Abaeté. Transformação – $\log(y)$ e teste t ($p < 0,05$).

Tabela 8. Volume ocupado pelos diferentes tipos de muco nas diferentes regiões das brânquias de fêmeas coletadas nos dois pontos de estudo.

| Ponto | Tipo A (%) | | Tipo B (%) | | Tipo C (%) | |
|----------------------------|------------------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| | JB | JA | JB | JA | JB | JA |
| Filamento | 5,0 ± 2,0 | 5,5 ± 0,7 | 4,3 ± 1,0 | 4,1 ± 0,8 | 0,02 ± 0,02 | 0,06 ± 0,03 |
| Lamela | 1,6 ± 0,4 | 2,4 ± 0,7 | 4,3 ± 0,7 | 2,8 ± 0,7 | 0,4 ± 0,2* | 0,4 ± 0,08 |
| Espaço interlamelar | 5,4 ± 1,6 ^a | 19,2 ± 6,7 | 8,8 ± 2,0 | 12,7 ± 3,0 | 0,1 ± 0,1 | 0,6 ± 0,3 |

Valores representados pelas médias ± EPM. a: valores significativos entre os pontos de estudo. *: $p = 0,058$. JB: imediatamente abaixo da represa de Três Marias e JA: Rio São Francisco após confluência com o rio Abaeté. Transformação – $\log(y)$ e teste t ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO

1. Condições ambientais nos pontos de estudo no Rio São Francisco

A concentração de alguns metais encontrados na água e sedimento dos pontos de coleta no Rio São Francisco apresentaram valores superiores aos estabelecidos pela resolução do CONAMA 357/2005 e pelos Valores Guia de Qualidade de Sedimento (VGQS) respectivamente.

Dessa forma no sedimento, o presente estudo mostrou que o ponto JB apresentou concentrações de Cd acima do PEC (*Probable Effect Level*), 3,5 mg/Kg, enquanto que o trecho referência (JA) apresentou concentrações dentro do estabelecido para o TEC (*Threshold Effect Level*), 0,6 mg/Kg . Em relação ao As, o ponto JB apresentou concentrações quase três vezes maiores ao estabelecido para o PEC (17 mg/Kg), enquanto em JA, o trecho de referência desse estudo, apresentou-se no limite máximo estabelecido para o PEC e cerca de 3 vezes maior que o estabelecido para o TEC (5,9 mg/kg). Em 2007, um estudo realizado no mesmo ponto de coleta (JB) apresentou concentração de As no sedimento inferiores à 5 mg/Kg, o que representa um aumento de quase 10 vezes na concentração desse metal no ponto estudado (Silva, 2007). Dessa forma, a toxicidade baseada no VGQS sugere que no ponto JB exista probabilidade elevada de incidência de efeitos adversos para a biota aquática, associada às concentrações de As e Cd.

De acordo com a Portaria nº 715/MINTER/IBAMA, os pontos estudados do rio São Francisco, possuem água de classe II. Dessa forma, segundo parâmetros estabelecidos na resolução do CONAMA 357/2005, as concentrações de Cd

presentes na água em JB foram 2,3 vezes maiores que o máximo estabelecido para as águas de classe II ($1\mu\text{g/L}$). Estudos anteriores, no mesmo ponto de estudo (JB) e na mesma estação do ano, não apresentaram violação dos parâmetros para a concentração de Cd na água (Silva, 2007; Ribeiro, 2010).

Em relação ao Mn, o ponto de estudo JB apresentou concentrações 2 vezes maiores que o permitido, enquanto em JA, a concentração encontrada foi cerca de 1,3 vezes maior que o permitido para águas de classe II ($100\mu\text{g/L}$). Dessa forma, segundo o Índice de Contaminação por Tóxicos (ICT), as águas do rio São Francisco no ponto JB apresentam contaminação alta (ANA, 2009). Adicionalmente, ambos os pontos de estudo (JB e JA) apresentaram pH ácido o que aumenta a biodisponibilidade dos metais no ambiente (Ribeiro, 2010) e os maiores valores de condutividade apresentados em JB indiretamente sugere a maior contaminação desse ponto de estudo.

O As e o Cd, os principais contaminantes encontrados na água e sedimento nesse estudo, ocupam o 1º e o 7º lugar respectivamente na lista das substâncias tóxicas prioritárias para a espécie humana, segundo a “*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*” (*Priority List of Hazardous Substance*, 2011). Entretanto, a concentração de metais no ambiente não é considerada nas legislações brasileiras que determinam o índice de balneabilidade das águas e o panorama da qualidade de águas superficiais do Brasil visando o abastecimento público, podendo assim comprometer a saúde humana e dos animais (CONAMA Nº 274/2000; ANA, 2005; ANA, 2009). Mesmo não se considerando esse fator, o último relatório sobre o Panorama da Qualidade das Águas no Brasil apontou que

nas proximidades do ponto JB, o valor do IQA era de 67, representando águas de qualidade razoável (ANA , 2005).

A concentração de metais no ponto JB provavelmente aponta a influência da empresa (Votorantim Metais Zinco S.A), uma vez que os pontos de amostragem da água e sedimento ocorreram a jusante do local de descarga dos efluentes tratados da empresa e da foz do córrego Consciência, onde se localiza a barragem de rejeitos desativada, que apresenta estrutura abalada e presença de vazamentos (Silva, 2007). Além disso, a menor concentração de metais no ponto JA pode decorrer também do transporte, diluição e distribuição dos metais ao longo do rio (Oliveira e Horn, 2006; Silva, 2007; Ribeiro, 2010).

2. Brânquias de *Prochilodus argenteus*

A estrutura das brânquias da espécie em estudo é semelhante à estrutura geral das brânquias de teleósteos (Wilson and Laurent, 2002; Evans et al, 2005). Entretanto, ultraestruturalmente, as células do epitélio branquial apresentam algumas diferenças em relação a outros teleósteos. As CPV de *P. argenteus* apresentaram em seu citoplasma vesículas elétron-densas que já haviam sido descritas para peixes não teleósteos como o *hagfish* (Laurent, 1984; Mallat e Paulsen, 1986) e mais recentemente observadas em tilápia *Oreochromis niloticus* (Monteiro et al, 2010). Essas vesículas, não descritas em outros teleósteos com exceção dos já citados, sugerem que as CPVs também desempenhem alguma função secretória no epitélio branquial.

As células cloreto (CC) apresentaram morfologia semelhante a de outros teleósteos. Entretanto não foi possível observar claramente os subtipos das células cloreto como demonstrado em outros teleósteos (Pisam et al, 1990; Perry, 1997; Maina, 1991; Monteiro et al, 2010).

Por sua vez, as células mucosas (CM) de *P. argenteus* apresentaram em seu citoplasma grânulos com diferentes elétrons-densidades e isso pode estar correlacionado com os diferentes tipos e grau de glicosilação das proteínas sintetizadas por essas células, conforme mostrado pela histoquímica de PAS-AB (2,5) nesse estudo. Grânulos com diferentes elétrons-densidades também foi observado em células mucosas de carpas (Iger et al, 1994).

As células neuroendócrinas (CNE) de *P. argenteus* foram observadas próximas à lamina basal e dos vasos sanguíneos, como descrito por Dunel-Erb (1982) e também nas trutas (Coolidge et al, 2008). Essa localização justifica-se pela função de quimiorreceptor de O₂ e CO₂ (Jonz e Zaccone, 2009; Quin et al, 2010). Entretanto, em algumas espécies de teleósteos como o *Carassius auratus*, *Hoplias lacerdae*, e *Hoplias malabaricus*, essas células também foram encontradas no epitélio das lamelas, sugerindo possível envolvimento das mesmas em funções parácrinas (Coolidge et al, 2008).

Dessa forma, a estrutura do epitélio branquial de *P. argenteus* não possui diferenças significativas de outros teleósteos. Isso permite a comparação de estudos utilizando os biomarcadores apresentados em outras espécies de teleósteos bem como em outros locais impactados.

3. Histopatologias da brânquia de *P. argenteus* como biomarcadores de impacto ambiental

As histopatologias encontradas no presente estudo são frequentemente observadas em brânquias de organismos expostos a ambientes contaminados ou em ensaios laboratoriais de exposição aos contaminantes (Domingos et al, 2007; Costa et al, 2009; Abdel-Moneim et al, 2012). Adicionalmente, as histopatologias refletiram as condições ambientais dos dois pontos estudados, bem como machos e fêmeas apresentaram diferente susceptibilidade aos contaminantes, atribuída às dissimilaridades das ocorrências das histopatologias em animais provenientes do mesmo ponto de estudo. Dessa forma, o presente estudo mostra que o gênero dos animais exerce influência nas respostas dos biomarcadores histopatológicos nas brânquias de *P. argenteus*. Entretanto, poucos estudos na literatura consideram a variabilidade dos biomarcadores analisados quanto ao sexo dos animais (Veja-Lopez et al, 2007; Linde-Arias et al, 2008; Sanchez et al, 2008).

Os animais machos provenientes do ponto referência (JA) apresentaram maior ocorrência de lamelas apresentando fusão lamelar. Esse mecanismo de adaptação pode estar relacionado com maiores concentrações de oxigênio dissolvidas na água ($8,7 \text{ mg.L}^{-1}$) que desencadearia a proliferação de células entre as lamelas, diminuindo a superfície de contato com o ambiente (Sollid et al, 2003; Nilsson, 2007). Entretanto, a fusão lamelar pode ser decorrente da hiperplasia lamelar ou da presença de células inflamatórias entre as lamelas (Abdel-Moneim et al, 2012). No presente estudo, a ocorrência de lamelas

apresentando hiperplasia foi maior em espécimes do ponto contaminado (JB) e a ocorrência de espaços interlamelares com presença de focos inflamatórios foi maior em fêmeas do ponto de referência (JA), corroborando a hipótese de que a fusão lamelar, no presente estudo, pode estar atuando como mecanismo fisiológico para a manutenção do equilíbrio osmótico.

Peixes expostos a sedimentos e água contaminados com metais tais como Cd, As, Cu, Pb apresentaram alta incidência de lamelas com hiperplasia e edemas (Domingos et al, 2007; Pandey et al, 2008; Costa et al, 2009; Abdel-Moneim et al, 2012). No presente estudo, a maior ocorrência de hiperplasia lamelar em brânquias de animais provenientes de JB, pode ser estar associada às altas concentrações de As e Cd no sedimento e água. A hiperplasia lamelar, caracterizada pelo espessamento do epitélio das lamelas, atua como barreira ao acesso dos poluentes a circulação sanguínea e por consequência sua distribuição sistêmica (Richmonds e Dutta, 1989; Ortiz et al, 2003). Adicionalmente, a hiperplasia lamelar é um marcador ambiental menos influenciado pelo sexo dos animais, uma vez que ambos os sexos apresentaram maior ocorrência dessas alterações no ponto contaminado, facilitando a interpretação dos dados, caso esse parâmetro seja aplicado em programa de monitoramento ambiental no local (Burger et al, 2007).

Entretanto, o edema lamelar apresentou alta variabilidade quanto ao gênero dos peixes. Esse comportamento sugere que os machos poderiam estar acumulando mais metais nos tecidos que as fêmeas, conforme descrito para

diversas espécies de peixes na literatura (Burger, 2007; Burger et al, 2007; Vahter et al, 2007).

4. Elementos da imunidade inata como marcadores de impacto ambiental

4.1. Atividade de MPO e EPO

A presença de MPO em neutrófilos de teleósteos foi descrita no sangue periférico de *zebrafish* (Bennet et al, 2001). No presente estudo, os animais provenientes do ponto contaminado (JB) apresentou menor atividade da MPO, com marcação localizada principalmente abaixo da lâmina basal do filamento, em granulomas e dentro do seio lamelar. Essa localização, associada à menor atividade da MPO e aos outros parâmetros imunológicos analisados (EPO, células *rodlet* e mucosas), sugere que os animais machos de JB apresentam-se na fase crônica do processo inflamatório. Dessa forma, a maior atividade de MPO nos animais fêmeas do mesmo ponto indica que esses animais respondem de forma diferente às mesmas condições ambientais. Em mamíferos, os genes codificantes da enzima MPO apresentam polimorfismos que variam de acordo com o gênero dos animais. O alelo MPO-463A, cria um sítio de ligação adicional para o receptor de estrógeno no promotor para MPOA, em que o estrógeno aumenta a atividade do promotor para MPOA (Liu et al, 2004). A influência do estrógeno no aumento da atividade da mieloperoxidase em granulócitos de mulheres também foi evidenciada no trabalho de Jansson (1991). Dessa forma, sugerimos que em *P. argenteus* a atividade da mieloperoxidase é influenciada pelo sexo do animal, reforçando a necessidade de considerá-los inclusive ao determinar biomarcadores de impacto ambiental. Diferentemente, no ponto de

referência (JA) ambos os gêneros apresentaram maior atividade da MPO localizada preferencialmente nos filamentos, caracterizando possível fase aguda de processo inflamatório.

Apesar dos machos de JB apresentarem menor atividade da enzima EPO, o que sugere imunossupressão, a análise dos outros parâmetros imunológicos indicam que esses animais se encontram-se em estágio de resolução do processo inflamatório. A imunossupressão nos animais pode aumentar a susceptibilidade dos organismos aquáticos à infecções (Zelicoff et al, 1995).

4.2. Células *rodlet*

O presente estudo mostrou que as células *rodlet* apresentam diferentes estádios de desenvolvimento no epitélio de branquial. Além disso, as células em estádios iniciais de desenvolvimento apresentaram marcação para a proteína S100 na cápsula e no citoplasma da célula. No presente estudo, células *rodlet* em estádios iniciais de desenvolvimento apresentaram cápsulas delgadas e formato arredondado enquanto nos estádios tardios foi marcante a presença de cápsulas espessas e fibrosas, além do formato alongado, conforme descrito em diversas espécies de teleósteos (Leino, 1974; Mazon et al, 2007; Bielek, 2008; Vigliano et al, 2009). Adicionalmente, os grânulos das células rodlets de *Psetta maxima* L. apresentam marcação para S100 na região central dos grânulos elétron-densos e na cápsula (Vigliano et al, 2009). Dessa forma, no presente estudo sugerimos que, além de desempenhar a função de estimular a nucleação e polimerização de

microtúbulos (DePasquale, 2012), essa proteína também é um componente estrutural da cápsula. Micrografias eletrônicas de transmissão de células em estágio intermediário de desenvolvimento sugere a fusão dos grânulos elétrondensos com a cápsula. Adicionalmente, a marcação para S100 na cápsula e nos grânulos dessas células no mesmo estágio de desenvolvimento corroboram essa hipótese. As células *rodlets* maduras de *P. argenteus* não apresentaram marcação evidente para S100, similar a fraca marcação obtida por imunogold realizada por Vigliano e colaboradores (2009), o que sugere que essa proteína não se encontra em grande quantidade na cápsula de células rodlets maduras.

Em teleósteos, as células *rodlets* são descritas em diversos processos inflamatórios causados por microorganismos, parasitas e até mesmo ambiente contaminado por metais. Entretanto, não está claro na literatura a função exercida por essa célula dentro do processo inflamatório (Dezfuli et al, 2003; Reite, 2005; Dezfuli et al, 2007; Mazon et al, 2007).

No processo inflamatório em mamíferos, a fagocitose de células apoptóticas geram sinais que suprimem a ativação de macrófagos pró-inflamatórios, contribuindo para a resolução do processo inflamatório (De Lorenzo et al, 2010). Estudo realizado por De Lorenzo et al, mostra que a proteína S100A9 presente em neutrófilos de mamíferos, e também liberada por neutrófilos em apoptose, está envolvida na sinalização da supressão de macrófagos pró-inflamatórios, atuando assim na resolução da inflamação (De Lorenzo et al, 2010). A proteína S100A9 também estimula a liberação de grânulos de gelatinase e não de grânulos azurofílicos (contendo MPO) em neutrófilos, o que indica que essa

proteína estimula a migração celular (Simard et al, 2010). Dessa forma, o presente trabalho sugere que as células rodlet estão envolvidas no processo de resolução do processo inflamatório em *P. argenteus*. A grande ocorrência das células rodlets em machos provenientes do ponto contaminado (JB) está associada a menor atividade da enzima MPO, o que indiretamente pode indicar apoptose de neutrófilos ou a não liberação dos grânulos azurofílicos, além de provável supressão dos macrófagos pró-inflamatórios pelas células rodlets. Ademais, foi observada maior frequência de granulomas nos machos do ponto contaminado (JB). De fato; foi observada a presença de células rodlets, células em apoptose e macrófagos no espaço interlamelar utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão.

4.3. Células mucosas

A hiperplasia das células mucosas no epitélio branquial de teleósteos tem sido frequentemente observada em ambientes impactados por derramamento de óleo (Giari et al, 2012), infecções por parasitos (Dezfuli et al, 2010) e também por contaminação por pesticidas (Teh et al, 1997; Paulino et al, 2012). A exposição aguda do *Prochilodus lineatus* ao herbicida atrazina mostrou hiperplasia de células mucosas do tipo A no filamento (Paulino et al, 2012). Entretanto, no presente estudo, os peixes do ponto contaminado (JB) apresentaram diminuição de volume do filamento ocupado por células mucosas do tipo A.

Por outro lado, houve tendência ao aumento do volume ocupado por células do tipo C no filamento dos animais machos, mas esse aumento é muito pequeno e não substitui o decréscimo do volume ocupado por células mucosas do tipo A. Esse comportamento também foi observado no teleósteo *Abramis brama* proveniente de ambiente contaminado por derramamento de óleo, porém esse estudo não considerou as possíveis diferenças entre os gêneros dos animais (Giari et al, 2012). Houve ainda aumento do volume das lamelas ocupadas por células do tipo C em machos do ponto contaminado. As glicoproteínas ácidas sulfatadas e carboxiladas presentes nessas células possuem maior viscosidade e podem servir de barreira física para a entrada dos poluentes pelas lamelas (Iger et al, 1994). Além disso, sugere-se que a hiperplasia lamelar observada em machos de JB pode ser parcialmente explicada pela proliferação desse tipo celular. Esse resultado, à semelhança a outros parâmetros da resposta imune

inata analisados indicam de que machos de JB apresentam-se em resolução do processo inflamatório.

CONCLUSÕES

- A hiperplasia lamelar foi a única alteração histopatológica não influenciada pelo sexo dos peixes, apresentando relação positiva com o trecho contendo as concentrações elevadas de Cd e As.
- As maiores frequências de fusão lamelar foram observadas em peixes do sexo masculino no trecho de maior concentração de oxigênio dissolvido.
- O edema lamelar foi a única característica a apresentar diferenças entre os gêneros em todos os pontos estudados.
- As maiores frequências de infiltrados inflamatórios, células mucosas tipo A e atividades de EPO e MPO, que são inversamente relacionadas a ocorrência de células rodlet e células mucosas tipo C, sugerem que esses elementos podem estar relacionados ao processo de resposta imune inata.
- Diferentemente do observado para a atividade de EPO, a atividade de MPO e células mucosas do tipo A e B apresentam-se influenciadas pelos gêneros dos peixes.
- Os parâmetros analisados podem ser utilizados como biomarcadores de qualidade do ambiente aquático, considerando-se que o sexo exerce influência nos mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltonen TM, Jokinen EI, Salo HM, Markkula SE, Lammi R. 2000a. Modulation of immune parameters of roach, *Rutilus rutilus*, exposed to untreated ECF and TCF bleached pulp effluents. *Aquatic Toxicology* 47:277–289.

Aaltonen TM, Jokinen EI, Lappivaara J, Markkula SE, Salo HM, Leppanen H, Lammi R. 2000. Effects of primary- and secondary-treated bleached kraft mill effluents on the immune system and physiological parameters of roach. *Aquatic Toxicology* 51:55–67.

Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, Elmenshawy OM. 2012. Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia. *Chemosphere* 88:1028–1035.

Adamko DJ, Wu Y, Gleich GJ, Lacy P, Moqbel R. 2004. The induction of eosinophil peroxidase release: improved methods of measurement and stimulation. *Journal of Immunological Methods* 291:101–108.

Agostinho AA. 1992. Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In: Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil. Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia. Maringá: Editora UEM, 127p.

Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabitto IS, Ribeiro CAO. 2007. Immunological responses, histopathological finding and disease resistance of blue mussel (*Mytilus edulis*) exposed to treated and untreated municipal wastewater. *Aquatic Toxicology* 82:1–14.

Alberto A; Camargos AFM, Verani JR, Costa OFT, Fernandes MN. 2005. Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from a sewage-contaminated river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 61:247–255.

ANA SPR. 2005. Agência Nacional de Águas, Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. In, Panorama da qualidade das águas superficiais no Brasil. Brasília. 176p.

ANA SPR. 2009. Agência Nacional de Águas, Superintendência de Planejamento de Recursos Hídricos. In, indicadores de Qualidade da Água. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/Indicadores>.

Anthony RM, Rutitzky LI, Urban Jr JF, Stadecker MJ, Gause WC. 2010. Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology* 7:975-987.

Arantes FP, Santos HB, Rizzo E, Sato Y, Bazzoli N. 2011. Collapse of the reproductive process of two migratory fish (*Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*) in the Três Marias Reservoir, São Francisco River, Brazil. *Journal of Applied Ichthyology* 27:847-853.

Arellano JM, Storch V, Sarasquete C. 2003. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Journal of Applied Ichthyology* 20:452–460.

ATSDR. 2011. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Priority List of Hazardous Substances. Division of Toxicology and Environmental Medicine Atlanta.

Bagenal TB, Tesch FW. 1978. Age and Growth. In: *Methods for Assessing of Fish Production in Freshwaters*. Bagenal, T.B. (Ed.). 3rd Edn. N^o. 3, Blackwell Scientific Publication Ltd, p.101-136.

Balla KM, Lugo-Villarino G, Spitsbergen JM, Stachura DL, Hu Y, Bañuelos K, Romo-Fewell O, Aroian RV, Traver D. 2010. Eosinophils in the zebrafish: prospective isolation, characterization, and eosinophilia induction by helminth determinants. *Blood* 111 (19):3944-3954.

Bancroft JD, Gamble M. 2007. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone; 6 edition, 744p.

Bennett CM, Kanki JP, Rhodes J, Liu TX, Paw BH, Kieran MW, Langenau DM, Delahaye-Brown A, Zon LI, Fleming MD, Look AT. 2001. Myelopoiesis in the zebrafish, *Danio rerio*. Blood 98(3): 643-650.

Bernet D, Schmidt H, Meier W, Burkhardt-Holm P, Wahlil T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases 22:25-34.

Biagini FR, David JAO, Fontanelli CS. 2009. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. Micron 40:839–844.

Bielek E. 2005. Development of the endoplasmic reticulum in the rodlet cell of two teleost species. 2005. The Anatomical Record A 283:239–249.

Bielek E. 2008. Membrane transformations in degenerating rodlet cells in fishes of two teleostean families (Salmonidae, Cyprinidae). The Anatomical Record 291:1693–1706.

Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LEJ. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology 25:853-873.

Burger J, Fossi C, McClellan-Green P, Orlando EF. 2007. Methodologies, bioindicators, and biomarkers for assessing gender-related differences in wildlife exposed to environmental chemicals. Environmental Research 104:135–152.

Burger J. 2007. A framework and methods for incorporating gender-related issues in wildlife risk assessment: Gender-related differences in metal levels and other contaminants as a case study. Environmental Research 104:153–162.

Calabrese EJ. 1991. Multiple Chemical Interactions. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, p. 704.

Chapman PM, Wang F, Adams WR, Green A. 1999. Appropriate Applications of sediment quality values for metals and metalloids. *Environmental Science and Technology* 33:3937-3941.

Chapman PM, Anderson J. 2005. A decision-making framework for sediment contamination. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1(3):163-173.

Canadian Council of Ministers of the Environment. 2002. Canadian sediment quality guidelines for the protection of aquatic life: Summary tables. Updated. In: Canadian environmental quality guidelines, 1999, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg.

Capkin E, Altinok I, Karahan S. 2006. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere* 64: 1793–1800.

Cengiz EI, Unlu E. 2006. Sublethal effects of commercial deltamethrin on the structure of the gill, liver and gut tissues of mosquitofish, *Gambusia affinis*: A microscopic study. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21:246–253.

CETEC, 1980. Estudos de Metais Pesados no Estado de Minas Gerais. Relatório Final. Belo Horizonte. 151p.

Colombo JC, Bilos C, Remes-Lenicov M, Colautti D, Landoni P, Brochu C. 2000. Detritivorous fish contamination in the Río de la Plata estuary: a critical accumulation pathway in the cycle of anthropogenic compounds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57:1139-1150.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 274 de Março de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. Disponível em: www.mma.gov.br/conama.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 344 de Março de 2004. Estabelece as diretrizes gerais e os procedimentos mínimos para a avaliação do material a ser dragado em águas jurisdicionais brasileiras, e dá outras providências. Disponível em: www.mma.gov.br/conama.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução 357 de Março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões para o lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: www.mma.gov.br/conama.

Coolidge EH, Ciuhandu CS, Milsom WK. 2008. A comparative analysis of putative oxygen-sensing cells in the fish gill. *Journal of Experimental Biology* 211:1231-1242.

Costa CMR, Hermann G, Martins CS, Lins LV, Lamas IR. 1998. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 94p.

Costa PM, Diniza MS, Caeiroa S, Lobo J, Martinsc M, Ferreirac AM, Caetano M, Valec C, DelVallsd TA, Costa MA. 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology* 92: 202–212.

de la Torre FR, Ferrari L, Salibia A. 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere* 59:577–583.

Dabrowska H, Ostaszewska T, Kamaszewski M, Antoniak A, Napora-Rutkowski L, Kopko O, Lang T, Fricke NF, Lehtonen KK. 2012. Histopathological, histomorphometrical, and immunohistochemical biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 78:14–21.

Dautremepuits C, Marcogliese DJ, Gendron AD, Fournier M. 2009. Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment* 407:1055-1064.

De Lorenzo BHP, Godoy LC, Novaes e Brito RR, Pagano RL, Amorim-Dias M.A., Grosso DM, Lopes JD, Mariano M. 2010. Macrophage suppression following phagocytosis of apoptotic neutrophils is mediated by the S100A9 calcium-binding protein. *Immunobiology* 215:341–347.

Dezfuli BS, Giari L, Simoni E, Palazzi D, Manera M. 2003. Alteration of rodlet cells in chub caused by the herbicide Stam[®]M-4 (Propanil). *Journal of Fish Biology* 63: 232–239.

Donato R. 2001. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33:637–668.

Dezfuli BS, Giari L, Shinn AP. 2007. The role of rodlet cells in the inflammatory response in *Phoxinus phoxinus* brains infected with *Diplostomum*. *Fish and Shellfish Immunology* 23:300-304.

DePasquale JA. 2012. Rodlet cells in epidermal explant cultures of *Lepomis Macrochirus*. *Acta Zoologica*. DOI: 10.1111/azo.12013.

Dezfuli BS, Squerzanti S, Fabbri S, Castaldelli G, Giari L. 2010. Cellular response in semi-intensively cultured sea bream gills to *Ergasilus sieboldi* (Copepoda) with

emphasis on the distribution, histochemistry and fine structure of mucous cells. *Veterinary Parasitology* 174:359–365.

Domingos FXV, Azevedo M, Silva MD, Randi MAF, Freire CA, Assis HAS, Ribeiro CAO. 2007. Multibiomarker assessment of three Brazilian estuaries using oysters as bioindicators. *Environmental Research* 105:350-363.

Doyon JF, Downing JA, Manin E. 1988. Variation in the condition of northern pike, *Esox lucius*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 45:479-83.

Dunel-Erb S, Bailly Y, Laurent P. 1982. Neuroepithelial cells in fish gill primary lamellae. *Journal of Applied Physiology* 53:1342-1353.

Erkmen B, Kolankaya D. 2000. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64:418-425.

Esteves FA, Amorim JC, Cardoso EL, Barbosa FAR. 1985. Caracterização limnológica preliminar da represa de Três Marias (MG) com base em alguns parâmetros ambientais básicos. *Ciência e Cultura*, 37: 608–617.

Evans DH. 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 71:47-58.

Evans DH, Piermarini PM, Potts WTW. 1999. Ionic transport in fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283: 641–652.

Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiology Reviews* 85:97–177.

Faurschou M, Borregaard N. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and Infection* 5:1317–1327.

Fisher SJ, Willis DW, Pope KL. 1996. An assessment of burbot (*Lota lota*) weight-length data from North American populations. *Canadian Journal of Zoology* 74:570-5.

Franco de Camargo SA & Petreire MJR. 2001. Social and financial aspects of the artisanal fisheries of Middle São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Fisheries Management and Ecology* 8:163-171.

Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB. 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environmental Science & Technology* 38:1723-1731.

Giari L, Dezfuli BS, Lanzoni M, Castaldelli G. 2012. The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 77:18–27.

Godinho AL, Godinho HP. 2003. Breve visão do São Francisco. Em, *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, MG, 291p.

Gomes MVT, Costa A.S, Garcia CAB, Passos EA, Alves JPH. 2010. Concentrações e associações geoquímicas de Pb e Zn em sedimentos do rio São Francisco impactados por rejeitos da produção industrial de zinco. *Quimica Nova* 33 (10):2088-2092.

Gona O. 1979. Mucous glycoproteins of teleostean fish: a comparative histochemical study. *Histochemical Journal* 11:709-718.

Griffiths D, Kirkwood RC. 1995. Seasonal variation in growth, mortality and fat stores of roach and perch in Lough Neagh, Northern Ireland. *Journal of Fish Biology* 47:537-554.

Hughes CM. 1984. General anatomy of the gills. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish Physiology* 10A: 1-72. New York: Academic Press.

Hutchinson TH, Field MDR, Manning MJ. 2003. Evaluation of non-specific immune functions in dab, *Limanda limanda* L., following short-term exposure to sediments contaminated with polyaromatic hydrocarbons and/or polychlorinated biphenyls. *Marine Environmental Research* 55:193–202.]

IBAMA. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Portaria nº 715 de 20 de setembro de 1989 .Define o enquadramento e nível de qualidade de água (classe) do rio São Francisco e tributários.

IBGE. 2005. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In Pesquisa de Informações Básicas Municipais – Perfil dos Municípios Brasileiros. Suplemento de Meio Ambiente, 382p.

Iger Y, Lock RA, van der Meij JC, Wendelaar Bonga SE.1994. Effects of water-borne cadmium on the skin of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 342-350.

Jago CH, Haines TA. 1997. Changes in gill morphology of atlantic Salmon (*Salmo Salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. *Environmental Pollution* 97(12):137-146.

Jonz MG, Zaccone G. 2009. Nervous control of the gills. *Acta Histochemica*. 111:207-216.

Jansson G. 1991. Oestrogen-induced enhancement of myeloperoxidase activity in human polymorphonuclear leukocytes: a possible cause of oxidative stress in inflammatory cells, *Free Radical Research Communications* 14:195-208.

Jordanova M, Miteva N, Rocha E. 2007. A quantitative study of the hepatic eosinophilic granule cells and rodlet cells during the breeding cycle of Ohrid trout, *Salmo letnica* Kar. (Teloestei, Salmonidae). *Fish & Shellfish Immunology* 23:473-478.

Kabutomori O, Yanagihara T, Iwatani Y, Kawarazaki A, Kabutomori M. 1999. Sex difference in myeloperoxidase activity of neutrophils. *American Journal of Hematology* 60:312–313.

Katzenback BA, Belosevic M. 2009. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish (*Carassius auratus L.*) kidney. *Developmental and Comparative Immunology* 33:601–611.

Koponen K, Myers MS. 2000. Seasonal changes in intra-and interorgan occurrence of rodlet cells in freshwater bream. *Journal of Fish Biology* 56:250–263.

Kumari U, Yashpal M, Mittal S, Mittal AK. 2009. Histochemical analysis of glycoproteins in the secretory cells in the gill epithelium of a catfish, *Rita rita* (Siluriformes, Bagridae). *Tissue and Cell* 41:271–280.

Laurent P. 1984. Gill internal morphology. In: Hoar WS, Randall DJ, editors. *Fish Physiology*, Vol. 10A. New York: Academic Press. p. 73-183.

Leino RL. 1974. Ultrastructure of immature, developing, and secretory rodlet cells in fish. *Cell and Tissue Research* 155:367-378.

Lieschke GJ, Oates AC, Crowhurst MO, Ward AC, Layton JE. 2001. Morphologic and functional characterization of granulocytes and macrophages in embryonic and adult zebrafish. *Blood* 98 (10):3087-3096.

Linde-Arias AR, Inácio AF, Novo LA, Albuquerque C, Moreira JC. 2008. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environmental Pollution* 156: 974-979.

Liu G, Zhoua W, Wang LI, Park S, Miller DP, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ Sua L, Christiani DC. 2004. MPO and SOD2 polymorphisms, gender, and the risk of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Letters* 214:69–79.

Lizama MAP, Ambrósio AM. 2002. Condition factor in nine species of fish of the Characidae family in the upper Paraná river floodplain, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 62:113-124.

McCarthy JF, Halbrook RS, Shugart LR. 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Publication n°. 3072, ORNL/TM-11783. Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.

McGucking MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH. 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 9:265-278.

Maina JN. 1991. A morphometric analysis of chloride cells in the gills of the teleosts *Oreochromis alcalicus* and *Oreochromis niloticus* and a description of presumptive urea-excreting cells in *O. alcalicus*. *Journal of Anatomy* 175:131-145.

Mallatt J, Paulsen C. 1986. Gill ultrastructure of the pacific hagfish *Eptatretus stouti*. *American Journal of Anatomy* 177:243-269.

Manera M and Dezfuli BS. 2004. Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. *Journal of Fish Biology* 65:597–619.

Martinez-Alvarez RM, Morales AE, Sanz A. 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15:75–88.

Matisz CE, Goater CP, Bray D. 2010. Density and maturation of rodlet cells in brain tissue of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to trematode cercariae. *International Journal of Parasitology* 40:307–312.

Mazon AF, Huising MO, Taverne-Thiele AJ, Bastiaans J, Verburg-van Kemenade BML. 2007. The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. *Fish & Shellfish Immunology* 22:27-37.

Milinkovitch T, Godefroy J, Théron M, Thomas-Guyon H. 2011. Toxicity of dispersant application: Biomarkers responses in gills of juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Environmental Pollution* 159 (10):2921-2928.

Mohanty BR, Sahoo PK. 2010. Immune responses and expression profiles of some immune-related genes in Indian major carp, *Labeo rohita* to *Edwardsiella tarda* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 28:613-621.

Monteiro SM, Fontainhas-Fernandes A, Sousa M. 2004. Caracterização morfológica e ultrastrutural do epitélio branquial de peixes teleósteos. *Reviews Port. Zootec. XI*: 13–36.

Monteiro SM, Oliveira E, Fontainhas-Fernandes A, Souza M. 2010. Fine structure of the branchial epithelium in the teleost *Oreochromis niloticus*. *Journal of Morphology* 271:621–633.

Mozeto AA, Jardim WF, Umbuzeiro GA. 2006. Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas e Ensaio Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce. 1ª Edição. Cubo Editora, 224p.

Nakatani K; Agostinho A A; Baumgartner G, Bialecki A; Sanches PV, Makrakis, MC; Pavanelli CS. 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce. Desenvolvimento e manual e identificação. Editora EDUEM, Maringá, PR, p. 203-205.

Nero V, Farwella A, Listerb A, Kraakb VGD, Leec LEJ, Meerd TV, MacKinnone MD, Dixona DG. 2006. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63:365–377.

Nilsson GE, Renshaw, GMC. 2004. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *Journal of Experimental Biology* 207:3131-3139.

Nilsson GE. 2007. Gill remodeling in fish –a new fashion or an ancient secret? *Journal of Experimental Biology* 210:2403-2409.

Oliveira MR, Horn AF. 2006. Comparação da concentração de metais pesados nas águas do rio São Francisco em Três Marias, desde 1991 até hoje, relacionando a atuação da CMM - Três Marias. *Geonomos* 14(1, 2):55-63.

Olson KR. 2002. Vascular anatomy of fish gill. *Journal of Experimental Zoology* 293:214–231.

Ortiz JB, Gonzalez de Canales ML, Sarasquete C. 2003. Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fish. *Scientia Marina*. 67:53-61.

Palic D, Andreasen CB, Menzel BW, Roth JA. 2005. A rapid, direct assay to measure degranulation of primary granules in neutrophils from kidney of fathead minnow (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Fish & Shellfish Immunology* 19:217-227.

Pandey S, Parvez S, Ansaria RA, Ali M, Kaur M, Hayat F, Ahmada F, Raisuddina S. 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. *Chemico-Biological Interactions* 174:183-192.

Paulino MG, Souza NES, Fernandes MN. 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:6-13.

Peakall DW. 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicology and Ecotoxicology News* 1: 55–60.

Perry SF. 1997. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology* 59:325–47.

Pisam M, Boeuf G, Prunet P, Rambourg A. 1990. Ultrastructural features of mitochondria-rich cells in stenohaline freshwater and seawater fishes. *American Journal of Anatomy* 187:21-31.

Poltronieri C, Laurà R, Bertotto D, Negrato E, Simontacchi C, Guerrera MC, Radaelli G. 2009. Effects of exposure to overcrowding on rodlet cells of the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (L.) *Veterinary Research Communications* 33:619–629.

Qin Z, Lewis JE, Perry SF. 2010. Zebrafish (*Danio rerio*) gill neuroepithelial cells are sensitive chemoreceptors for environmental CO₂. *Journal of Physiology* 588:861-872.

Reynolds WF, Hiltunen M, Pirskanen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Lehtovirta M. 2000. MPO and APOEepsilon4 polymorphisms interact to increase risk for AD in Finnish males. *Neurology* 55:1284–1290.

Reite OB. 2005. The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. *Fish & Shellfish Immunology* 19.3:253-257.

Ribeiro CAO, Belger L, Pelletier E, Rouleau C. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Environmental Research* 90: 217–225.

Ribeiro EV. 2010. Avaliação da qualidade da água do Rio São Francisco no segmento entre Três Marias e Pirapora – MG: metais pesados e atividades antropogênicas. Dissertação de Mestrado. Departamento de Geografia. Instituto de Geociências. Universidade Federal de Minas Gerais, 196 p.

Ribeiro HJ, Procópio MS, Gomes JMM, Vieira FO, Russo RC, Balzuweit K, Chiarini-Garcia H, Castro ACS, Rizzo E, Corrêa Jr JD. 2011. Functional dissimilarity of melanomacrophage centres in the liver and spleen from females of the teleost fish *Prochilodus argenteus*. *Cell and Tissue Research* 346(3):417-425.

Richmonds C, Dutta HM. 1989. Histopathological changes induced by malathion in the gills of bluegill *Lepomis macrochirus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 43:123-130.

Robert SD, Powell MD. 2003. Comparative ionic flux and gill mucous cell histochemistry: effects of salinity and disease status in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 134:525-537.

Saborowski R, Buchholz R. 1996. Annual changes in the nutritive state of North Sea dab. *Journal of Fish Biology* 49:173-94.

Sampaio EV, López CM. 2003. Limnologias física, química e biológica da represa de Três Marias e do São Francisco. Em, *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, MG, 291p.

Sanches JG, Speare DJ, Johnson GJ. 1997. Morphometric and histochemical assessment of the branchial tissue response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), associated with chloramine-T treatment. *Journal of Fish Diseases* 20:375–381.

Sanchez W, Piccini B, Maxence Ditché J, Porcher JM. 2008. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environmental International* 34:791–798.

Sato Y, Godinho HP. 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. In, *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*, (Carolsfelds J, Harvey B, Ross C, Baer A. eds). IDRC and World Bank, Victoria, p. 195-232.

Sato Y, Bazolli N, Rizzo E, Boschi MB, de Miranda MOT. 2005. Influence of the river Abaeté in the reproductive success of the Neotropical migratory teleost

Prochilodus argenteus in the São Francisco River, downstream from the Três Marias dam, southeastern Brazil. *River Research and Applications* 8: 939-950.

Schmitt CJ. and Dethloff GM. editors. 2000. *Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program: selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems*. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, (MO): Information and Technology Report USGS/BRD-2000--0005. 81 p

Shephard K.L. 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4:401-429.

Siderits D, Bielek E. 2009. Rodlet cells in the thymus of the zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Fish and Shellfish Immunology* 27:539–548.

Silphaduang U, Colorni A, Noga EJ. 2006. Evidence of widespread distribution of piscidin antimicrobial peptides in teleost fishes. *Disease of Aquatic Organisms* 72:241–252.

Silva EFA. 2007. *Pesquisa participativa no Rio São Francisco, região de Três Marias –MG: Contaminação ambiental e comunidade pesqueira*. Dissertação de mestrado. Departamento de Química. Universidade Federal de São Carlos, p 94.

Simard JC, Girard D, Tessier PA. 2010. Induction of neutrophil degranulation by S100A9 via a MAPK-dependent mechanism. *Journal of Leucocyte Biology* 87:905-914.

Simonato JD, Fernandes MN, Martinez CBR. 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology* 20:1400–1410.

Sollid J, Angelis PD, Gundersen K, Nilsson GE. 2003. Hypoxia induces adaptive and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *Journal of Experimental Biology* 206:3667-3673.

Sollid J, Kjærnsli A, De Angelis PM, Røhr AK, Nilsson GE. 2005. Cell proliferation and gill morphology in anoxic crucian carp. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 289:R1196–R1201.

Sollid J, Weber RE, Nilsson GE. 2006. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *Journal of Experimental Biology* 208:1109-1116.

Sroussi HY, Lu Y, Villines D, Sun Y. 2012. The down regulation of neutrophil oxidative metabolism by S100A8 and S100A9: Implication of the protease-activated receptor-2. *Molecular Immunology* 50:42– 48.

Sternberg EM. 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature Reviews Immunology* 6(4): 318–328.

Teh SJ, Adams SM, Hinton DE. 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology* 37:51-70.

Tort L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology* 35:1366–1375.

Tribskorn R, Böhmer J, Braunbeck T, Honnen W, Köhler HR, Lehmann R. 2001. The project VALIMAR (validation of biomarkers for the assessment of small stream pollution): objectives, experimental design, summary of results, and recommendations for the application of biomarkers in risk assessment. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8:161–78.

Umbuzeiro GA. 2006. Avanços e dificuldades na interpretação e implementação da resolução CONAMA 357 de 2005. In *Anais do IX Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, São Pedro. p6.

US NRC (US National Research Council). 1989. Biologic markers in pulmonary toxicology. Washington, DC, National Academy Press, 179.

Vahter M, Kesson AA, Lide C, Ceccatelli MB. 2007. Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environmental Research* 104:85–95.

van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13:57-149.

Vega-López A, Galar-Martínez M, Jiménez-Orozco FA, García-Latorre E, Domínguez-López ML. 2007. Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 146: 672–678.

Velkova-Jordanoska L, Kostoski G. 2005. Histopathological analysis of liver in Fish (*Barbus Meridionalis Petenyi* Heckel) in reservoir Trebenita. *National Croatian* 14:147-153.

Vigliano FA, Bermudez R, Nieto JM, Quiroga MI. 2009. Development of rodlet cells in the gut of turbot (*Psetta maxima* L.): Relationship between their morphology and S100 protein immunoreactivity. *Fish and Shellfish Immunology* 26:146-153.

Zelikoff JT, Bowser D, Squibb KS, Frenkel K. 1995. Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 45 (3):235-248.

Zuckerman SH, Bryan N. 1996. Inhibition of LDL oxidation and myeloperoxidase dependent tyrosyl radical formation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene (LY139481 HCL), *Atherosclerosis* 126:65–75.

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30:347–570.

Wilson JM and Laurent P. 2002. Fish gill morphology: Inside out. *Journal of Experimental Zoology* 293:192–213.

Weeks BA, Anderson DP, DuFour AP, Fairbrother A, Goven A.J, Lahvis GP, Peters G. 1992. Immunological biomarkers to assess environmental stress. In: Huggett RJ, Kimerly RA, Mehrle PM, Jr Bergman HL. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, p. 211-234.

WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). 1993. *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 175/2011**, relativo ao projeto intitulado "**Influência do gênero e período de coleta na avaliação de biomarcadores de impacto ambiental no rio São Francisco utilizando branquias de curimba (*Prochilodus Argenteus*)**", que tem como responsável(is) **José Dias Corrêa Junior**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 03/2012**.

Este certificado expira-se em **14/ 03/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 175/2011**, related to the project entitled "**Multibiomarker assessment of São Francisco river using curimba (*Prochilodus Argenteus*) gill: a gender and season approach**", under the supervisors of **José Dias Corrêa Junior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **March 14, 2012**.

This certificate expires in **March 14, 2017**.

Belo Horizonte, 16 de Março de 2012.

Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br