

**Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas**

**“AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, MOLECULAR E BIOQUÍMICA DO  
FÍGADO, BAÇO E CENTROS MELANOMACROFÁGICOS DO PEIXE  
TELEÓSTEO *Prochilodus argenteus* COMO BIOMARCADORES DE IMPACTO  
AMBIENTAL NO RIO SÃO FRANCISCO”**

**HEDER JOSÉ RIBEIRO**

**Belo Horizonte  
Novembro – 2011**

**HEDER JOSÉ RIBEIRO**

**“AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA, MOLECULAR E BIOQUÍMICA DO  
FÍGADO, BAÇO E CENTROS MELANOMACROFÁGICOS DO PEIXE  
TELEÓSTEO *Prochilodus argenteus* COMO BIOMARCADORES DE IMPACTO  
AMBIENTAL NO RIO SÃO FRANCISCO.”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular.

**Orientador: Dr José Dias Corrêa Júnior  
Departamento de Morfologia**

**Belo Horizonte  
Novembro – 2011**

043

Ribeiro, Heder José.

Avaliação histopatológica, molecular e bioquímica do fígado, baço e centros melanomacrofágicos do peixe teleósteo *Prochilodus argenteus* como biomarcadores de impacto ambiental no Rio São Francisco. [manuscrito] / Helder José Ribeiro.  
- 2011.

123 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientador: José Dias Corrêa Júnior.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Morfologia.

1. *Prochilodus argenteus* – Teses. 2. Fígado – Histopatologia – Teses. 3. Baço – Histopatologia – Teses. 4. Centro melanomacrofágico. 5. Grânulos. 6. Marcadores biológicos – Teses. 7. São Francisco, Rio (MG) – Aspectos ambientais – Teses. I. Corrêa Júnior, José Dias. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Morfologia. III. Título.

CDU: 576.3



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO**  
**HEDER JOSÉ RIBEIRO**

96/2011/08  
entrada  
1º/2008  
2008671431

Às **quatorze horas** do dia **23 de novembro de 2011** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Avaliação histopatológica, molecular e bioquímica do fígado, baço e centros melanomacrofágicos do peixe teleosteo *Prochilodus argenteus* como biomarcadores de impacto ambiental no rio São Francisco”**, requisito final para obtenção do Grau de Doutor em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. José Dias Corrêa Junior**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

| Prof./Pesq.                   | Instituição | Indicação |
|-------------------------------|-------------|-----------|
| Dr. José Dias Corrêa Junior   | UFMG        | APROVADO  |
| Dra. Gleydes Gambogi Parreira | UFMG        | APROVADO  |
| Dr. Remo de Castro Russo      | UFMG        | APROVADO  |
| Dr. Hélio Batista dos Santos  | UFSJ        | APROVADO  |
| Dra. Silvana Allodi           | UFRJ        | APROVADO  |

Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO  
O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 23 de novembro de 2011.**

Dr. José Dias Corrêa Junior José Dias Corrêa Junior  
(Orientador)  
Dra. Gleydes Gambogi Parreira Gleydes Gambogi Parreira  
Dr. Remo de Castro Russo Remo de Castro Russo  
Dr. Hélio Batista dos Santos Hélio Batista dos Santos  
Dra. Silvana Allodi Silvana Allodi

Denise Carmona Cara Machado  
Profa. Denise Carmona Cara Machado  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular, ICBI/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

*"O sonho encheu a noite  
Extravasou pro meu dia  
Encheu minha vida  
E é dele que eu vou viver  
Porque sonho não morre".*

*Adélia Prado*



*Dedico esse trabalho aos meus familiares, em especial  
Meu Pai Antônio, minha Mãe Graça, meus irmãos Tatá e Érico, minha filha Swara,  
e minha amada Lidiiane  
Essa conquista é nossa!!!*

## Agradecimentos

A Deus, e a tudo que ele representa: Força, entusiasmo e fé. Deus não erra!

Ao Prof. Dr. José Dias Corrêa Júnior, meu orientador, amigo e “Pai Acadêmico”. Pelos 6 anos de trabalho, as vezes árduo, mas produtivo. Agradeço pelos merecidos “puxões de orelha” e elogios, quando esses cabiam. No fim dessa jornada afirmo em alto e bom tom: Foi uma honra trabalhar com você!

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Santana Castro por tudo, desde as corridas na Lagoa da Pampulha, os ensinamentos constantes e grandes momentos de descontração.

Ao Professor Emérito Dr. José Carlos Nogueira pelos ensinamentos moldados na forma de “momentos culturais”. Pelos conselhos pertinentes e por aprender que “a gente não vira Professor, nasce”.

À Professora Dra. Elizete Rizzo pelo apoio sempre tão importante.

À Professora Dra. Karla Balzuweit pelo substancial apoio na realização das microanálises de raio-x, quando essas eram apenas um “teste”.

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

Ao Professor Dr. Hélio Chiarini Garcia quem sempre esteve pronto para ajudar quando precisei.

À querida e amiga Professora Dra. Gleydes Gambogi Parreira, por ser ao mesmo tempo amiga, Professora, orientadora e grande incentivadora.

Ao Professor Dr. Rômulo Cerqueira Leite da Escola de Veterinária, por me acolher nos primeiros passos da tão sonhada Biologia Molecular.

Ao Professor Dr. Almir de Sousa Martins do Departamento de Fisiologia por tornar realidade as análises de Biologia Molecular.

Ao amigo e Professor Dr. Hélio Batista dos Santos da Universidade Federal de São João Del Rei que foi o primeiro a acreditar nisso tudo.

Ao amigo e agora também Professor Dr. Remo de Castro Russo do Departamento de Fisiologia, que mesmo eu deixando o laboratório “com cheiro de peixaria”, nunca mediu esforços para ajudar nas análises bioquímicas.

Ao amigo e Professor Chico do Instituto Metodista Izabela Hendrix, pela ajuda em dispensada sempre.



Às colegas de laboratório e grandes amigas Betânia, Juliana, Kelly e Marcela, pela amizade, e valorosa contribuição dispensada.

À aluna de IC Larissa Dumbá, pela amizade e substancial ajuda no desenvolvimento final do trabalho.

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

Às amigas Déborah e Helen pela amizade e indescritível ajuda nas análises de Biologia Molecular

À Fabiana Alves pela ajuda impar, sem igual, única, nas análises Moleculares. Sua ajuda foi da boa Bibi.

À Professora Ana Ribeiro, por acima de tudo me ensinar que Deus não erra!

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.

À Sibeles e Diana secretária da Pós-Graduação em Biologia Celular

À Ana Paula Secretária do Departamento de Morfologia

Aos Colegas do Curso de Ciências Biológicas da UFMG modalidade a Distância

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, Mixirica, Samyra, Sarah, Herman, Fabrício Flávio, Ana Luisa “Leitegada”, Priscila Valadão, e tantos outros com quem vivi momentos de estudo e descontração. Muito obrigado a todos.

À minha família com quem divido essa conquista, Meu pai Antônio, minha mãe Graça, meus irmãos, Érico e Tatá. Sem vocês não seria possível chegar aqui! AMO VOCÊS!!!!!!!!!!!!!!

À Swara, Deusa do meu sol, meu Bebê, razão de tanta luta. Papai te ama muito!!!!!!

À minha “família de BH”, Toninho, Cordolina, Gil, Luiza e em especial minha cunhada Viviane “te amo véi”

A minha esposa linda, Lidiane, por estar comigo desde o início dessa caminhada, árdua e às vezes sofrida, sabendo me ouvir e agüentar meu mau humor quando os experimentos insistiam em dar errado. Você é essencial em minha vida, obrigado pelo apoio constante e por fazer parte da minha vida. Te amo!

Aos meus verdadeiros amigos: Bruno Tubias, Gláucio & Lelê & “Joval”, Carneiro, Fabrício, Rachel, Gabriel, Mateus, Dudinha e os recém-chegados Ricardo, Alice e Tatá que

acompanharam de perto esta trajetória, sempre dando força, incentivo e sempre me fazendo acreditar que tudo é possível.

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.

## SUMÁRIO

|                             |      |
|-----------------------------|------|
| Lista de figuras-----       | XIII |
| Lista de abreviaturas ----- | XV   |
| Resumo -----                | XVI  |
| Abstract -----              | XVII |

## INTRODUÇÃO ----- 1

|  |    |
|--|----|
| 1. Fígado-----                               | 4  |
| 2. Baço -----                                | 8  |
| 3. Centros melanomacrofágicos (CMMs) -----   | 9  |
| 4. Modelo ambiental e experimental -----     | 11 |
| 5. Grânulos intracelulares-----              | 13 |
| 6. Biomarcadores -----                       | 14 |
| 6.2 Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1a)----- | 16 |

## JUSTIFICATIVA ----- 18

## OBJETIVOS----- 20

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 3. Objetivo Geral-----         | 21 |
| 4. Objetivos específicos ----- | 21 |

## MATERIAIS E MÉTODOS ----- 23

|  |    |
|--|----|
| 1. Área de estudo -----  | 24 |
| 2. Coleta dos espécimes de <i>Prochilodus argenteus</i> -----  | 24 |
| 3. Caracterização dos parâmetros físico químicos dos pontos de coleta-----   | 25 |
| 4. Processamento histológico-----  | 26 |
| 5. Caracterização morfológica e histopatológica-----   | 27 |
| 6. Caracterização morfométrica dos CMMs -----  | 28 |
| 7. Morfometria da área dos grânulos dos CMMs.-----   | 28 |
| 8. Microscopia eletrônica de transmissão - MET -----   | 29 |
| 9. Microscopia analítica e microanálise de raios-x -----   | 29 |
| 10. Quantificação do acúmulo de macrófagos nos tecidos por determinação da atividade de N-acetyl-glicosaminidase ----- | 30 |
| 11. Expressão do Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1a) -----   | 30 |

## RESULTADOS ----- 34

|   |    |
|---|----|
| 1. Animais, biometria e índices somáticos-----                      | 35 |
| 2. Parâmetros físico-químicos da água -----                         | 36 |
| 3. Metais na água e sedimentos -----                                | 37 |
| 4. Histologia e análise histopatológica -----                       | 37 |
| 5. Análise histoquímica dos CMMs.-----                              | 39 |
| 6. Análises morfométricas -----                                     | 42 |
| 7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) -----                | 43 |
| 8. Microscopia analítica e microanálise de raios-x -----            | 48 |
| 9. Quantificação da atividade de N-Acetylglucosaminidase (NAG)----- | 49 |
| 10. Expressão de HIF-1-----   | 50 |

|   |            |
|---|------------|
| <b>DISCUSSÃO</b> -----  | <b>52</b>  |
| <b>CONCLUSÕES</b> -----   | <b>58</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> -----   | <b>60</b>  |
| <b>ANEXOS</b> -----   | <b>70</b>  |
| 1. <b>Trabalho I</b> -----  | <b>71</b>  |
| Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen<br>from the Females of the Teleost Fish <i>Prochilodus argenteus</i> |            |
| <b>Trabalho II</b> -----  | <b>98</b>  |
| Environment influences on <i>Prochilodus argenteus</i> liver collected from São<br>Francisco river, Brazil                                    |            |
| 2. <b>Protocolo Cetea</b> -----   | <b>120</b> |
| 3. <b>Protocolos experimentais</b> -----  | <b>121</b> |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Espécie curimatã-pacu *prochilodus argenteus* \_\_\_\_\_ 13
- Figura 2: Esquema mostrando os dois diferentes pontos de estudo \_\_\_\_\_ 24
- Figura 3: Gráfico mostrando os índices somáticos: (a) índice hepatossomático e (b) Fator de condição de Fulton dos animais nos diferentes pontos de coleta \_\_\_\_\_ 35
- Figura 4: Tabela mostrando os parâmetros físico-químicos da água nos dois pontos estudados \_\_\_\_\_ 36
- Figura 5: Tabela mostrando a quantificação de metais (As, Cd Zn, Cu, Mn) em água e sedimento nos dois pontos de estudo \_\_\_\_\_ 36
- Figura 6: Micrografias de luz do fígado de *P. argenteus* mostrando aspectos histológicos e histopatológicos de animais dos dois pontos estudados \_\_\_\_\_ 38
- Figura 7: Histograma mostrando análise semi-quantitativa das lesões histopatológicas do fígado de *P. argenteus* \_\_\_\_\_ 39
- Figura 8: Micrografias de luz de técnicas histoquímicas de Ácido Periódico de Shiif (PAS), Perls e von Kossa \_\_\_\_\_ 40
- Figura 9: Micrografias de luz de técnicas histoquímicas de Fucsina Aldeida e Masson Fontana em cortes de fígado e baço de *P. argenteus* \_\_\_\_\_ 41
- Figura 10: Gráfico mostrado número médio de CMM no fígado e baço de *P. argenteus* 42
- Figura 11: Gráfico mostrando a distribuição de frequência da área dos CMMs no fígado e baço de *P. argenteus* \_\_\_\_\_ 42
- Figura 12: Gráfico mostrando a distribuição de CMMs por tamanho (pequenos e grandes) no fígado de *P. argenteus* \_\_\_\_\_ 43
- Figura 13: Gráfico mostrando a área ocupada pelos grânulos de melanina, hemossiderina e lipofuscina nos CMMs do fígado e baço de *P. argenteus* \_\_\_\_\_ 43
- Figura 14: Eletromicrografias de um hepatócito de *P. argenteus* mostrando suas principais características ultra estruturais \_\_\_\_\_ 45
- Figura 15: Eletromicrografias de um CMM do fígado de *P. argenteus* mostrando suas principais características ultra estruturais \_\_\_\_\_ 46
- Figura 16: Eletromicrografias de um CMM do baço de *P. argenteus* mostrando suas principais características ultra estruturais \_\_\_\_\_ 47
- Figura 17: Eletromicrografias de um particulado de ferritina no CMM do fígado de *P. argenteus* e um espectro mostrando sua composição elementar \_\_\_\_\_ 48

Figura 18: Eletromicrografias geradas através de excitação de elétrons secundários e retro-espalhados e espectro obtido por raios-x identificando composição de grânulos eletrondensos presentes em CMMs do fígado e do baço de *P. argenteus* \_\_\_\_\_49

Figura 19: Gráfico mostrando a produção de N-acetilglicosaminidade (NAG) de homogenizados de fígado e baço de *P. argenteus* \_\_\_\_\_50

Figura 20: Gráfico mostrando a expressão do Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1a) do fígado de *P. argenteus* \_\_\_\_\_51

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{m}$  – micrômetro

nm – Nanômetro

$\text{mm}^2$  – Milímetro quadrado

ATP – Trifosfato de adenosina

C - Carbono

Ca – Cálcio

Cl - Cloro

cm - Centímetro

CMMs – Centro melanomacrofágicos

Fe - Ferro

g – grama

EDS- Espectrometro de Energia Dispersiva

IHS- Índice hepatossomático

JA – Trecho de coleta imediatamente à jusante da barragem

JB - Trecho de coleta à jusante da confluência com o rio Abaeté

K – Fator de condição de Fulton

Na – Sódio

O - Oxigênio

P - Fósforo

PAS – Ácido Periódico de Shiff

RER – Retículo endoplasmático rugoso

Si – Silício

S - Enxofre

As - Arsênio

Cd - Cádimo

Cu - Cobre

Zn - Zinco

Mn - Manganês

HIF-1a- Fator induzido por Hipóxia

NAG - N-acetilglicosaminidase

## Resumo

As características histopatológicas do fígado, baço e centros melanomacrófágicos (CMMs) do peixe teleósteo *Prochilodus argenteus* e suas características bioquímicas e moleculares foram investigadas a partir de animais coletados em dois diferentes pontos do rio São Francisco à jusante da represa de Três Marias. Também foi realizada a caracterização ambiental dos pontos de coleta. Imediatamente após a coleta fragmentos hepáticos e esplênicos foram fixados em líquido de Bouin e de Karnovsky para as avaliações morfológicas. Outros fragmentos foram congelados em gelo seco para análises bioquímicas e moleculares. Análises morfométricas foram utilizadas para caracterizar a estrutura do parênquima hepático e esplênico. Nossos resultados demonstraram importantes diferenças na citoarquitetura hepática e composição dos CMMs nos diferentes órgãos analisados. Eventos patológicos foram mais frequentemente vistos nos animais oriundos do ponto imediatamente a jusante da represa. O tamanho, quantidade de CMMs bem como a composição dos grânulos foram também avaliados. O conjunto de dados sugere que discrepâncias nos fatores ambientais observados podem agir de forma adjuvante na indução de alterações na citoarquitetura hepática da espécie *P. argenteus*, sugerindo que o fígado e os CMMs dessa espécie possa ser utilizado como ferramenta na avaliação de ambientais aquáticos degradados.



## Abstract

Histopathological features of the liver, spleen and melanomacrophage centers (MMC) of the teleost fish *Prochilodus argenteus* and their possible association with biochemical and molecular responses were investigated in animals collected from two different points of the river San Francisco downstream to the Três Marias dam. In each site of the study physico-chemical analyses from the water and sediment were also performed. *In loco* liver and splenic fragments were either fixed in Bouin's and Karnovsky liquid for morphological studies, or frozen in dry ice for biochemical and molecular analyses. Morphometric analyses were performed to characterize the structure of the liver and spleen. Our results showed significant differences in the liver cytoarchitecture and in the composition of MMCs between the different studied organs. Pathological events were more frequently seen in the animals from the site immediately downstream of the dam being related with the worst environmental quality associated with the presence of heavy metals in the water and sediment. The size, amount of MMCs and their granule composition were also evaluated. Our results suggest that differences in environmental factors may act adjuvant promoting changes in the hepatic cytoarchitecture of the species *P. argenteus*. The liver and MMC of this species presents differences among the collection sites, which t can be used as tool in the evaluation of environmental changes.

## **INTRODUÇÃO**

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas um aumento considerável das atividades antrópicas tem gerado um crescente processo de degradação ambiental. Em ambientes aquáticos a situação apresenta maior gravidade já que muitas destas ações causam estresse sobre os recursos hídricos, mediados por alterações de fatores físico-químicos da água, e deposição de xenobióticos como, poluentes orgânicos e metais pesados (TERRA et al, 2009). Todos esses fatores influenciam diretamente no crescimento, reprodução e saúde dos organismos aquáticos, e em especial da ictiofauna (MARCHAND et al, 2008). Essas ações antrópicas têm sido associadas principalmente à liberação de esgoto doméstico, descargas industriais e agrícolas (BERNET et al, 1999; VELKOVA-JORDANOSKA e KOSTOSKI, 2005), sendo que recentemente se tem discutido que a presença de barragens hidrelétricas também atua como um agente físico de estresse ambiental (AGOSTINHO et al, 1992; SAMPAIO e LÓPEZ, 2003).

A construção de barragens gera em curto prazo mudanças significativas nos ambientes aquáticos em decorrência de alterações hidrológicas à jusante das represas (ROMANINI et al, 1994), comprometendo principalmente as condições normais de temperatura e de oxigenação da água (AGOSTINHO et al, 1992). Dessa forma, as barragens hidroelétricas são tidas como um importante agente estressor (NERAAS e SPRUELL, 2001; AGOSTINHO et al, 2008).

A represa de Três Marias está localizada no rio São Francisco, na cidade de Três Marias, estado de Minas Gerais. Foi construída na década de 60 objetivando beneficiar a navegação, a produção de energia além de promover o controle da cheia do Rio São Francisco. Imediatamente à jusante da represa se observa a usina Companhia Mineira, que desenvolve atividades voltadas para a produção de derivados de zinco e de ácido sulfúrico (SAMPALIO e LÓPEZ, 2003). Entretanto, trabalhos que relacionam essas condições ambientais observadas à jusante da barragem ao metabolismo hepático de peixes teleósteos têm sido raros na literatura.

Neste ambiente ocorre naturalmente o peixe teleósteo *Prochilodus argenteus* que é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco. Possui hábitos detritívoros e é de grande porte atingindo até 15 kg de peso corporal (NAKATANI et al, 2001). Possui importância comercial, na região da represa de Três Marias, representando 50% do pescado da região (SATO e GODINHO, 2003).

De acordo com Bruslé e Anadon (1996), os peixes teleósteos são importantes para avaliar a presença e/ou a magnitude de agentes estressores nos ambientes aquáticos uma vez que esses animais estão diretamente inseridos nesses ambientes sob a ação dos agentes irritantes (GEORGE, 1982). Nesse contexto, o fígado dos peixes torna-se uma importante ferramenta de avaliação devido ao fato de ser um órgão central de metabolização de agentes potencialmente tóxicos o que o torna suscetível a interações do ambiente (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

## 1. Fígado dos peixes teleósteos

O fígado é considerado como o maior órgão interno e a maior glândula dos vertebrados. Nesses animais, o fígado está envolvido em inúmeras funções vitais, dentre as quais se destacam a rápida e eficiente armazenagem e metabolização de aminoácidos, carboidratos, colesterol, proteínas, lipídeos e vitaminas, além da produção e secreção da bile, e processos de detoxificação e fagocitose de substâncias principalmente oriundas da circulação esplênica (ROBBINS, 1994).

Macroscopicamente o fígado dos mamíferos é dividido em quatro lobos revestidos externamente por uma fina camada de tecido conjuntivo, denominada cápsula de Glisson. O parênquima hepático é constituído pelos lóbulos hepáticos microscopicamente compostos por placas anastomosadas de hepatócitos. Morfológicamente os lóbulos podem ser delimitados através de uma nítida camada de tecido conjuntivo. Em determinadas áreas entre os lóbulos, são observadas uma vênula e uma arteríola, que constituem, respectivamente, ramos da veia porta e artéria hepática, além de um ducto biliar. A essas regiões convencionou-se chamar de espaço porta hepático (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

Representando cerca de 60% da população celular do fígado e 80% do volume total do parênquima, os hepatócitos são morfológicamente poliédricos apresentando núcleo ovóide e central além de cromatina e nucléolo bem evidentes. Ultra estruturalmente, o volume celular dos hepatócitos é majoritariamente preenchido por retículo endoplasmático tanto na forma lisa quanto rugosa, ambos distribuídos difusamente pelo citoplasma e representando cerca de 15% do volume celular total (MALARKEY et al, 2005; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

Citoarquiteturalmente, os hepatócitos são arranjados sob a forma de cordões celulares. Tais cordões se dispõem em camada única de células de maneira análoga a uma “muralla celular” separados por capilares sinusóides longos e contínuos que convergem em um grande vaso, denominado veia central ou centrolobular. Na interface entre os cordões de hepatócitos e as células endoteliais dos capilares sinusóides existe o espaço de Disse, que abriga os macrófagos residentes ou células de Kupffer, que representam cerca de 15% da população celular do fígado (MALARKEY et al, 2005).

O suprimento sanguíneo hepático é constituído de duas vias distintas. Pela veia porta chegam ao fígado cerca de 70-80% do fluxo total. Esse aporte, proveniente do intestino delgado, é rico em nutrientes e pouco oxigenado. O restante do sangue vem

direto do coração, transportado pela artéria hepática, sendo, portanto bastante oxigenado. Por outro lado, o fluxo eferente converge através da veia hepática tributária que se encerra na veia cava (RAPPAPORT et al, 1954).

Nos peixes ósseos ou teleósteos, o fígado é um componente ativo do sistema digestivo, atuando em processos de armazenagem (glicogênio e gordura), síntese e secreção de proteínas e bile, além de ser o órgão central de metabolização tanto de substâncias endógenas quanto exógenas (BRUSLÉ e ANADON, 1996; SEGNER, 1998; MATOS et al, 2007; NETO et al, 2007). Adicionalmente, o fígado dos teleósteos atua na reprodução através da síntese de vitelogenina para maturação dos ovócitos (TAVARES-DIAS et al, 2000). Funcionalmente, existem dois tipos básicos de fígado teleósteo: a) o hepatopâncreas, no qual há porções de tecido pancreático associadas ao parênquima hepático e b) o modelo clássico de fígado, ou seja, sem associação com tecido pancreático (BRUSLÉ e ANADON, 1996; ROCHA e MONTEIRO, 1999; FIGUEIREDO-FERNANDES et al, 2007).

Assim como em outros vertebrados, nos teleósteos, o fígado é delimitado por uma fina camada de tecido conjuntivo, análoga à cápsula de Glisson dos mamíferos. Contudo, sua cápsula conjuntiva não projeta septos em direção ao parênquima do órgão (AKIYOSHI e INOUE, 2004). Em muitas espécies o fígado pode apresentar de dois a três lobos hepáticos. No entanto, fígado não lobado, caracterizado por apresentar uma massa celular única também pode ser observado (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

A ausência de septos conjuntivos no parênquima hepático dos teleósteos impede a formação dos lóbulos hepáticos. Neste contexto, não são evidenciadas nem as veias centrais ou centrolobulares nem os espaços porta (ramos da veia porta e artéria hepática e um ducto biliar), observados no fígado de outros vertebrados, tais como os mamíferos (ROCHA e MONTEIRO, 1999; AKIYOSHI e INOUE, 2004). Nos teleósteos, os vasos sanguíneos são encontrados de maneira profusa, aleatoriamente distribuídos pelo parênquima hepático. A distinção entre as veias e artérias hepáticas está principalmente no diâmetro do lume, que são mais estreitos nas artérias em decorrência da maior quantidade de fibras elásticas e pelo fato de que suas células endoteliais são mais volumosas (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

Os ductos biliares podem ocorrer isoladamente ou associados a vasos e artérias, nesse último caso fazendo lembrar a tríade portal presente nos mamíferos. A ocorrência dessas estruturas no fígado dos teleósteos origina as estruturas trato-biliares que são classificadas da seguinte forma: a) tipo isolado, onde um ducto biliar localiza-se

independentemente no parênquima hepático, estando circundado por tecido conjuntivo formando as ilhas biliares; b) trato arteríola-biliar, estabelecido pela associação entre uma arteríola e um ducto biliar; c) trato vênula-biliar, formado pela junção de uma vênula com um ducto biliar; d) tipo portal, análogo à tríade encontrada no espaço porta de outros vertebrados, forma-se da associação de um ducto biliar, uma vênula e uma arteríola (ROCHA e MONTEIRO, 1999; AKIYOSHI e INOUE, 2004; FIGUEIREDO-FERNANDES et al, 2007).

A organização vascular do fígado dos teleósteos consiste em dois vasos aferentes: a artéria hepática e a veia porta. Por outro lado, o fluxo eferente ocorre via veia hepática. Contudo, estudos anatômicos e fisiológicos sobre a vascularização hepática de peixes teleósteos são relativamente escassos (BRUSLÈ e ANADON, 1996). O parênquima hepático dos teleósteos é constituído de forma majoritária por hepatócitos, representando cerca de 95% dos componentes do fígado (LINDESJOJO et al, 1996). Histologicamente, os hepatócitos geralmente se apresentam poliédricos, fracamente basofílicos, com núcleos arredondados e centrais. Os hepatócitos podem se organizar de três formas distintas: a) em cordões, formando camada celular única separada por capilares sinusóides estreitos e compridos; b) em túbulos, compondo dupla camada de células separadas por sinusóides estreitos e tortuosos; c) de forma sólida, onde os hepatócitos se organizam sob a forma de massa celular gerando camadas múltiplas de células desconectadas por pequenos sinusóides estreitos e tortuosos (ROCHA e MONTEIRO, 1999; AKIYOSHI e INOUE, 2004). Nessa formação podem ocorrer diferenças na morfologia dos hepatócitos, onde os mesmos assumem forma mais arredondada apresentando também núcleos menores e ovalados. Segundo o tipo de arranjo celular os hepatócitos tendem a acumular lipídeos como forma de reserva energética (ROCHA et al, 2003; AKIYOSHI e INOUE, 2004).

Os hepatócitos apresentam citoplasma compartimentado, onde as organelas se agrupam preferencialmente em torno do núcleo ou na região periférica da célula. Entre essas áreas são observados depósitos de glicogênio, sendo que em algumas espécies os hepatócitos podem ser pobres em glicogênio, o qual é parcialmente substituído por lipídeos (ROCHA et al, 2003). Neste último caso, entre as áreas periféricas perinucleolares se observa grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso (ROCHA e MONTEIRO, 1999). No entanto, os hepatócitos dos teleósteos são relativamente pobres em organelas quando comparados aos de mamíferos. O complexo de Golgi é pouco desenvolvido e poucos peroxissomos e lisossomos são observados. As

mitocôndrias apresentam matriz densa podendo conter cristais e grânulos elétrondensos. O retículo endoplasmático liso é escasso. A membrana plasmática é diferenciada apresentando microvilos em ambas regiões, basal (excreção) e apical (absorção). A conexão hepatócito-hepatócito é mediada por desmossomos. Na aposição de dois ou mais hepatócitos são estabelecidos os canalículos biliares, por onde escoo a bile (BRUSLÉ e ANADON, 1996).

Tanto à microscopia de luz, quanto à microscopia eletrônica de transmissão, observam-se outros tipos celulares no fígado dos teleósteos (BRUSLÈ e ANADON, 1996; RABITTO et al, 2005). As células endoteliais apresentam forma alongada e núcleos protuberantes projetados para o lume dos capilares e vasos (ROCHA e MONTEIRO, 1999). No interstício, entre as células endoteliais e os hepatócitos, região estabelecida como espaço de Disse, se observada células denominadas perisinusoidais. Dessas, algumas alongadas com núcleo oval, podendo conter inclusões lipídicas, são descritas como células de Ito. No entanto células com morfologia semelhante diferem das células de Ito apenas na ausência de depósitos lipídicos. Estas células são descritas como células semelhantes a fibroblastos (“fibroblast-like”). Considerando a escassez e a semelhança morfológica desses dois tipos celulares no fígado dos teleósteos, o diagnóstico desses dois tipos celulares ainda é considerado difícil (BRUSLÈ e ANADON, 1996; ROCHA e MONTEIRO, 1999). Outro tipo de célula perisinusoidal são os macrófagos residentes ou células de Kupffer, possuidoras de núcleo pleomórfico e citoplasma claro, podendo conter corpos densos (ROCHA et al, 2003). Em algumas espécies, as células de Kupffer se localizam fora do espaço de Disse em íntima associação com vasos sanguíneos e ductos biliares (BRUSLÈ e ANADON; 1996; ROCHA e MONTEIRO, 1999), possuindo a capacidade de formar agregados eventualmente chamados de centros melanomacrofágicos (CMMs).

Em teleósteos, alguns autores (RABITTO et al, 2005; FISHELSON, 2006; van-DYK et al, 2006; MELA et al, 2007) descrevem alterações morfológicas e alguns processos patológicos em órgãos alvos como o fígado em decorrência de exposição a agentes agressores em ensaios experimentais. Contudo, a descrição destes processos em ambientes naturais é escassa na literatura. Uma vez que o tecido hepático funciona como um espelho do metabolismo (BRUSLÈ e ANADON, 1996), a avaliação histopatológica do fígado pode corroborar o estado geral do animal, podendo auxiliar na avaliação das condições ambientais.



## 2. Baço

Em mamíferos o baço é o maior órgão linfóide secundário do corpo, possuindo cerca de um quarto dos linfócitos do organismo (BALOGH et al, 2004). Anatomicamente, está localizado no lado esquerdo do abdome adjacente à grande curvatura do estômago. É alongado, apresentando forma piramidal quando visto em corte transversal. É revestido externamente por uma cápsula conjuntiva associada a fibras elásticas e uma fina camada de músculo liso (CESTA, 2006). Sua cápsula projeta-se para o interior do parênquima formando trabéculas, as quais divide o órgão em compartimentos incompletos. O parênquima não apresenta regiões de córtex e medula. Entretanto funcionalmente e morfológicamente o parênquima apresenta dois compartimentos distintos, a polpa vermelha e polpa branca (MEBIUS e KRAAL, 2005; CESTA, 2006).

A polpa vermelha é formada cordões esplênicos circundados por capilares sinusóides (cordões de Billroth) contendo linfócitos B e T, plasmócitos e macrófagos, sustentados por uma fina rede de fibras e células reticulares. Os cordões esplênicos da polpa vermelha atuam como um filtro de sangue onde hemácias velhas são destruídas pelo processo de hemocaterese, além de participar na defesa do organismo contra microorganismos (SAITO et al, 1988; CESTA, 2006).

A polpa branca é formada por três sub-regiões: a bainha linfóide periarteriolar, nódulos linfóides, e zona marginal, que é o limite entre a polpa branca e a polpa vermelha. Na zona marginal são observados linfócitos, macrófagos e células dendríticas que atuam diretamente sobre antígenos oriundos da circulação sanguínea, iniciando a resposta imunológica (SAITO et al, 1988; DIJKSTRA e VEERMAN, 1990).

O baço dos teleósteos é reconhecido pela sua cor vermelho escuro, in vivo, possuindo, na maioria das espécies, uma forma piramidal e localizando-se junto ao trato digestivo. Embora ocorra esta associação, ele não faz parte do sistema digestivo. Funcionalmente é o componente central do sistema imunológico, desempenhando importante papel na resposta contra invasão de patógenos e funcionando como filtro seletivo do sistema vascular (ARANTES et al, 2000). Além disso, outras funções têm sido atribuídas ao baço como órgão hemocaterético e, também, na maturação de linfócitos tanto para a resposta humoral quanto para a celular (FISHELSON, 2006).

Morfológicamente, o baço dos teleósteos possui semelhanças com o baço de outros vertebrados, salvo a diferenciação das porções da polpa vermelha e branca, as

quais não possuem delimitação característica (FISHELSON, 2006). A polpa vermelha ocupa o maior espaço do órgão organizando-se como compartimentos irregulares separados por cordões celulares estreitos. A polpa branca é mais discreta apresentando linfócitos aleatoriamente distribuídos em sua malha reticular e agregados de macrófagos associados a arteríolas (ZAPATA et al, 1996; PRESS e EVENSEN, 1998). Como no fígado, o baço também apresenta CMMs (WOLKE, 1992; HERRAEZ e ZAPATA, 1986; FOURNIE et al, 2001; AGIUS e ROBERTS, 2003).

Sob condições de estresse o baço pode apresentar depleção de células linfocíticas, congestão e necrose de células reticuloendoteliais (TEH et al, 1996). Dessa forma o estudo histopatológico do baço pode atuar como ferramenta biomarcadora de impacto ambiental uma vez que as possíveis alterações podem estar diretamente associadas ao estado saúde desses animais (GARCIA-ABIADO et al, 2004).

Similarmente ao fígado, no baço podem ser observados CMMs dispersos pelo parênquima esplênico (FOURNIE et al, 2001; AGIUS e ROBERTS, 2003; FISHELSON, 2006; SURESH, 2009). Frente a ambientes contaminados os CMMs esplênicos podem responder aumentando sua frequência e tamanho, fato que justifica alguns autores tenham sugerido o uso desses agregados como ferramenta biomarcadora de impacto ambiental (TEH et al, 1996; FOURNIE et al, 2001, LEKNES, 2007). Contudo, estudos visando uma análise histopatológica do baço em ambientes naturais, focando também nas análises dos CMMs demonstrando uma possível diferença dessas estruturas entre diferentes órgãos, como fígado e baço são raros na literatura.

### **3. Centro melanomacrofágicos (CMMs)**

Estes agregados de macrófagos podem acumular em seu citoplasma grânulos de melanina, hemossiderina e lipofuscina. Frente a estas características esses agregados de macrófagos foram classificados como centros melanomacrofágicos (CMMs) (ROBERTS, 1975; WOLKE, 1992; AGIUS e ROBERTS, 2003). Os CMMs também ocorrem em répteis e anfíbios, principalmente associados a órgãos, tais como: fígado, baço, rins e gônadas (BLAZER 2002; AGIUS e ROBERTS, 2003; FISHELSON, 2006). As funções atribuídas aos CMMs incluem: captura e armazenagem de ferro, apresentação de antígenos e fagocitose de restos celulares (WOLKE, 1992; LENKES, 2001; AGIUS e ROBERTS, 2003). Os CMMs também incorporam e detoxificam várias

substâncias como melanina e radicais livres, tornando os CMMs um importante alvo de estudo (WOLKE, 1992; AGIUS e ROBERTS, 2003; RABITTO et al, 2005).

Estruturalmente, os CMMs são envoltos por malha de fibras reticulares, contendo células alongadas (possivelmente fibrócitos), além de células linfóides e macrófagos (AGIUS e ROBERTS, 2003; RABITTO et al, 2005). A ocorrência dos grânulos de melanina, hemossiderina e lipofuscina nos CMMs pode ser um grande indicativo das principais atividades metabólicas desenvolvidas por estes grupos de macrófagos (AGIUS e ROBERTS, 2003). Lipofuscina e melanina são pigmentos endógenos insolúveis que se acumulam na célula em virtude de não poderem ser metabolizados por ela (RUBIN et al, 2006).

A lipofuscina, conhecida classicamente como pigmento do desgaste, faz parte de um grupo de pigmentos pardacentos derivados da oxidação de lipídeos ou de lipoproteínas geralmente insaturados e tem como significado autofagia (MONTENEGRO e FRANCO, 1995). Tal pigmento é geralmente encontrado em células permanentes, ou seja, em diferenciação terminal (neurônios e cardiomiócitos) ou que ciclam de forma infreqüente (estáveis, ex.: hepatócitos) (RUBIN et al, 2006). Tal pigmento deriva da renovação normal dos constituintes da membrana celular que juntos a fragmentos de organelas são segregados no interior de vacúolos autofágicos. A peroxidação de lipídeos insaturados e a formação de complexos lipídico-protéicos heterogêneos o torna resistente à degradação (RUBIN et al, 2006). Esse pigmento é resistente a solventes lipídicos, reduz sais de prata, é azul da Prússia-negativo, é PAS-positivo e se cora com corantes lipídicos. A lipofuscina pode ser resultante do aumento da substituição ou de lesão de membranas. Em algumas espécies de mamíferos, a lipofuscina aumenta em consequência da deficiência de vitamina E e selênio e, segundo PICKFORD (1953), deficiências na dieta dos peixes teleósteos podem ocasionar a deposição deste pigmento nos grânulos dos CMMs. Sob microscopia eletrônica de transmissão observam-se massas irregulares compostas por corpúsculos eléto-densos de diferentes tamanhos, embebidos em matriz de menor densidade.

A melanina (grego. *melas* = negro) é um pigmento cuja cor varia do castanho ao negro, é de natureza protéica (insolúvel em solventes comuns), sendo destruída pela oxidação ( $H_2O_2$  e permanganato de potássio). Os grânulos contendo melanina estão relacionados, segundo Wolke (1992), com a degradação de melanócitos. Agius e Roberts (2003) sugerem que a melanina possa absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos.

A hemossiderina é um produto de degradação da ferritina e está relacionada ao armazenamento e mobilização de ferro dentro das células dos CMMs (AISEN et al, 2001; LENKES, 2004). Sua característica hidrofóbica apresenta-se como uma vantagem dada a armazenagem em moléculas de ferritina que aumentam a formação de espécies reativas ao oxigênio (AISEN et al, 2001).

Alguns autores relatam um aumento no número e área dos CMMs em organismos submetidos a agentes agressores (HERRAZ e ZAPATA, 1986; WOLKE, 1992; AGIUS e ROBERTS, 2003; RABITTO et al, 2005; FISHELSON, 2006), sugerindo sua utilização como ferramenta biomarcadora de ambientes impactados. Todavia trabalhos que descrevem esses processos em ambientes naturais, procurando associar a ocorrência dos tipos de grânulos contendo pigmentos presentes nos macrófagos e relacionando com a morfologia tecidual e eventos patológicos são ausentes na literatura.

Associado à ocorrência dos CMMs, alguns autores (RABITTO et al, 2005; FISHELSON 2006; van-DYK et al, 2006; MELA et al, 2007) descrevem alterações morfológicas e/ou lesões histopatológicas hepáticas em decorrência de exposição a agentes agressores em ensaios experimentais. Contudo, a descrição desses processos em ambientes naturais é escassa na literatura.

#### **4. Modelo ambiental e experimental**

O navegador português Américo Vespúcio, no dia 04 de outubro de 1501, descobriu a foz de um rio na costa do nordeste brasileiro. Na data em questão comemorava-se o dia de São Francisco de Assis, surgindo assim o nome deste importante rio brasileiro. Desde a sua nascente no Parque Nacional Serra da Canastra, região sudoeste do Estado de Minas Gerais, até sua foz, o rio São Francisco percorre 2.900 km, atravessando cinco Estados brasileiros. Sua bacia é dividida em quatro segmentos: alto, médio, sub-médio e baixo São Francisco. Na região do alto São Francisco, na cidade de Três Marias em Minas Gerais, localiza-se a Barragem de Três Marias (GODINHO e GODINHO, 2003).

Com uma área inundada de 2.700 m de extensão, a barragem de Três Marias foi construída entre as décadas de 1950 e 1960, com o objetivo de promover o controle da

cheia do rio São Francisco, beneficiando a navegação, irrigação e principalmente a produção de energia (SAMPAIO e LÓPEZ, 2003).

Todavia, sabe-se que à jusante das barragens hidrelétricas as alterações no regime hidrológico podem ocasionar modificações de temperatura e oxigenação (AGOSTINHO et al, 1992). Esses fatores, segundo Sato et al, (2005) atuam diretamente sobre a ictiofauna ocasionando insucesso reprodutivo na espécie *Prochilodus argenteus*. Esse insucesso não é observado nos espécimes coletados a aproximadamente 35 km à jusante da represa, após a confluência com o rio Abaeté onde esses fatores são depurados (SATO et al, 2005).

Nesse contexto, Sampaio e López (2003) descrevem influências antrópicas nos primeiros 30 km à jusante da barragem, como ausência de mata ciliar, presença de populações ribeirinhas, áreas de pastagens e plantações. De forma similar a cerca de 1 km da barragem na margem direita do rio, localiza-se a Companhia Mineira de Metais que produz derivados de zinco e de ácido sulfúrico. Adicionalmente SATO et al (2005), demonstraram que valores menores para parâmetros físico-químicos da água como baixa temperatura e baixa oxigenação ocasionam interferência metabólica na espécie *P. argenteus* gerando um insucesso reprodutivo. Contudo, a literatura é carente de relatos que associem a possível interação de fatores naturais e antrópicos com o desenvolvimento de alterações morfológicas em órgãos de grande importância metabólica, tais como o fígado, na espécie *P. argenteus*. Um panorama diferente é observado em outro trecho no mesmo rio após a confluência com o rio Abaeté, cerca de 34 Km à jusante da barragem. Nesse trecho é demonstrado melhores valores para os parâmetros físico-químicos da água, principalmente de temperatura e oxigenação, Após a confluência com o rio Abaeté não é observado um comprometimento reprodutivo de *P. argenteus* (SATO et al, 2005).

O peixe teleósteo curimatã-pacu, *P. argenteus* (Characiformes: Prochilodontidae) (Figura 1), é espécie endêmica da bacia do rio São Francisco. Possui hábitos detritívoros, se alimentando de matéria orgânica e microorganismos associados à lama do fundo de lagos e rios. 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, 1988), possui importância comercial, representando 50% de toda a produção do pescado no alto São Francisco, região da Represa de Três Marias em Minas Gerais (SATO et al, 2003).

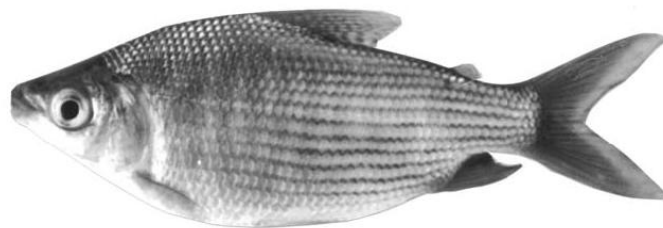


Figura 1. Curimatã-pacu *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829

## 5. Grânulos intracelulares

Sabe-se que os grânulos intracelulares ocorrem em organismos de todos os níveis tróficos e estão associados aos processos metabólicos de armazenagem, retenção, transporte e detoxificação (GEORGE, 1982). De forma similar, elementos químicos de alta relevância biológica apresentam sua distribuição alterada dentro de condições patológicas. A alteração desse metabolismo pode levar eventualmente à ocorrência ou ao acúmulo de precipitados mineralizados (como as calcificações patológicas) ou de pigmentos (como o de sais biliares) (ROBBINS, 1994).

Em exposições sub-letais as distribuições elementares teciduais e celulares são dependentes dos mecanismos expressos pelos organismos. Os principais mecanismos são descritos como: síntese de agentes quelantes, desenvolvimento de eficiente transporte ativo transmembranar, síntese induzida de metalotioneínas, exclusão por bloqueio através de barreira física via ação de lisossomos terciários e incorporação em grânulos insolúveis (PHILLIPS e RAINBOW, 1989; BROWN, 1982, GEORGE, 1982).

A gênese destes grânulos pode ocorrer por via anabólica, catabólica ou por ambas (SIMKISS, 1989; PALADE, 1975). Os metais do grupo A (Na, Mg, K, Ca) tendem a seguir esse processo anabólico. De forma diferente, os metais do grupo B (Fe, Cu, Zn, Ag, Cd, Au, Hg) seguem via catabólica envolvendo proteínas citosólicas como algumas albuminas, ferritina e principalmente metalotioneínas presentes no citoplasma que são recicladas através dos lisossomos primários e secundários resultando em corpos residuais (SOHAL et al, 1976; SIMKISS, 1989). Entretanto, esses dois sistemas podem se sobrepor intracelularmente gerando um sistema chamado de “protected pathways” ou vias de proteção (SIMKISS, 1989).

Alguns trabalhos descrevem a possibilidade de avaliar a composição externa ou ambiental de elementos contaminantes através da utilização de microanálise de raios-X

em grânulos intracelulares (SIMKISS, 1989). A análise qualitativa (de identificação de elementos químicos) e quantitativa pode ser realizada em microscópios eletrônicos de transmissão (MET) e de varredura (MEV) apresentando a vantagem de somar a composição à informação morfológica (TAYAL et al, 2000, NAGATA, 2004; CORRÊA JUNIOR et al, 2005). Esses grânulos precipitados ocorrem de forma cristalina ou amorfa onde sais contendo cálcio, fósforo e ferro são freqüentemente observados (GEORGE, 1982; TAYLOR e SIMKISS, 1989).

O ferro é um elemento crucial para diversas funções vitais. Todo ferro disponível no organismo é proveniente da dieta e ocorre na forma de ferro ferroso  $Fe^{2+}$ , ou ferro férrico  $Fe^{3+}$ . O ferro em excesso no organismo gera lesões e inclusive propicia a ativação de microrganismos não patogênicos tornando-os patogênicos (AISEN et al, 2001). Os mecanismos regulatórios do ferro são dependentes de proteínas para o transporte e armazenagem como a ferritina, responsável direta pela armazenagem do ferro dentro das células. O transporte do ferro no organismo é feito preferencialmente pela transferrina, sendo que outras proteínas são expressas quando os níveis de ferro estão acima do normal. Os mecanismos de disponibilização do ferro armazenado intracelularmente envolvem a quebra da ferritina, gerando outro importante componente no metabolismo do ferro que é a hemossiderina (AISEN et al, 2001).

De forma similar, o cálcio está envolvido em muitos processos vitais do organismo, tais como: estruturação óssea, atividade neuromuscular, ativação de linfócitos T e participação na regulação da apoptose (CARDENAS e HEITMAN, 1995; DOWLD, 1995; ALLGROVE, 2003). Sob condições de distúrbios metabólicos a conjugação do fósforo e/ou carbonato com o cálcio, formam precipitados os quais são depositados em diversos tecidos, tais como: hepático, muscular, renal e esplênico (GEORGE, 1982; ROBBINS, 1994) A formação dos grânulos intracelulares tem sido associada principalmente à enucleação dentro de mitocôndrias ou à degradação de membranas fosfolipídicas (TAYLOR e SIMKISS, 1989; GEORGE, 1982).

## **6. Biomarcadores**

Biomarcadores têm sido definidos como sendo a medida do fluído corporal, celular ou tecidual que indicam em níveis moleculares, bioquímicos ou celulares, a

presença de agentes estressores (McCARTHY e SHUGART, 1990; van der OOST et al, 2003). Em um sentido amplo se pode dizer ainda que o termo “biomarcador” pode ser aplicado a qualquer medida que reflete uma interação entre um sistema biológico e a ação de estressantes, que incluem agentes físicos, químicos ou biológicos (WHO, 1993).

Os biomarcadores podem ser subdivididos em três grupos: a) biomarcadores de exposição: que podem permitir a detecção e medição de uma substância exógena ou o produto de uma interação entre um agente xenobiótico dentro de um organismo; b) biomarcadores de efeito: estabelecido por alterações fisiológicas nos tecidos ou fluidos corporais de um organismo que possam ser associados a um estado de saúde já estabelecido ou a possíveis deficiências ou doenças; c) biomarcadores de suscetibilidade: processo que reflete a capacidade de um organismo em responder à exposição a uma substância específica, xenobióticos incluindo fatores genéticos e alterações em receptores que alteram a susceptibilidade de um organismo (NCR, 1987; WHO, 1993). A exemplo disso uma variedade de respostas histológicas, moleculares, bioquímicas e fisiológicas, tem sido citadas para identificar a exposição a xenobióticos no ambiente (van der OOST et al, 2003; AU, 2004).

Nos ambientes aquáticos os peixes ósseos, ou peixes teleósteos, podem atuar como uma importante ferramenta biomarcadora de exposição e de efeito por ocuparem o topo da cadeia alimentar (MANSOUR e SIDKY, 2002) e estarem completamente submersos no meio (GEORGE, 1982; TEH et al, 1997). Nos teleósteos o fígado é o principal órgão envolvido nos processos de detoxificação de compostos xenobióticos. Este fato faz com que o órgão seja um possível alvo das respostas biomarcadoras (HEALTH, 1995; BRUSLÈ e ANADON, 1996; van der OOST et al, 2003; AU, 2004) Hinton et al, (1992) e Hinton (1994) sugerem que o estudo histopatológico do fígado dos peixes é um importante biomarcador demonstrando a relação causal entre um estado de doença frente a um quadro de poluição. Além disso, essas análises histológicas de rotina sob o ponto de vista funcional apresentam alta sensibilidade aos agentes estressores, alta relação dose resposta, além de apresentarem baixo custo financeiro (AU, 2004). Entretanto, as alterações histológicas e/ou ultra-estruturais podem não ser exclusivas de um único agente estressor. Neste sentido torna-se essencial uma caracterização complementar utilizando-se biomarcadores moleculares e bioquímicos (ver SOITAMO et. al, 2001; SIROKÁ e DRASTICHOVÁ, 2004).

Em decorrência à queda de oxigênio, por exemplo, é descrito a expressão do fator induzido por hipóxia (HIF-1). Este fator pode ser um excelente biomarcador, uma



vez que se apresenta bastante conservado na escala evolutiva (SOITAMO et al, 2001). O HIF-1 é um heterodimérico composto de duas subunidades HIF- $\alpha$  e HIF- $\beta$ , sendo ambas membros da família PAS de fatores de transcrição (SOITAMO et al, 2001; NIKINMAA e REES, 2005). Entretanto estudos desse fator em peixes bem como sua aplicação prática em ensaios experimentais e principalmente em seus ambientes naturais ainda são inexistentes na literatura.

### **6.1. Fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1)**

Em mamíferos já se tem de forma bem estabelecida a descrição do fator induzido por hipóxia-1 (HIF-1) que controla a transcrição de vários genes envolvidos na eritropoiese, glicólise e angiogênese frente a um quadro de hipóxia (SOITAMO et al, 2001). Ainda em mamíferos, mais de 40 genes regulados por hipóxia tem sido caracterizados. (SEMENZA, 1999). Entretanto estudos que demonstrem a expressão do HIF-1 em peixes não têm sido amplamente realizados, principalmente relacionando flutuações nas tensões de oxigênio em ambientes naturais (SOITAMO et al, 2001; NIKINMAA e REES, 2005). Em mamíferos são estabelecidos duas subunidades para HIF, HIF- $\alpha$  HIF- $\beta$ , sendo ambas membros da família PAS de fatores de transcrição.

A subunidade  $\beta$  além de atuar na regulação gênica induzida por hipóxia, também dimeriza com o receptor de hidrocarboneto de arila (ARNT) durante a expressão gênica induzida por xenobióticos, desempenhando assim um papel importante na resposta de células expostas a dioxinas e outros hidrocarbonetos poluentes (NIKINMAA e REES, 2005; BAROUKI et al, 2007). Por outro lado a subunidade  $\alpha$ , que inclui HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$  são de respostas exclusivas a quadro de hipóxia (SOITAMO et al, 2001; KAJIMURA et al, 2006).

Em condições de normóxia HIF-1 se liga à proteína von Hippel-Lindau (VHL) e é alvo de ubiquitinação e conseqüentemente, de degradação via proteassoma. Ao contrário em condições de hipóxia a degradação do complexo HIF é inibida levando ao acúmulo de HIF-1 $\alpha$  dentro da célula. HIF-1 $\alpha$  transloca para o núcleo onde dimeriza com HIF-1 $\beta$  que se liga ao DNA e ativa a expressão gênica estimulando a produção e maturação de eritrócitos (IVAN et al, 2001; SOITAMO et al, 2001; KAJIMURA et al, 2006. BAROUKI et al, 2007).

Esse mecanismo de resposta gênica oxigênio-dependente, bem como o mecanismo de degradação em casos normóxia é tido como idêntico em mamíferos, *Xenopus* e na truta arco-íris, sugerindo um alto grau de conservação evolutiva na degradação e expressão do HIF-1 $\alpha$ . Contudo trabalhos que demonstrem a expressão destes fatores em ambientes naturais, e ainda à jusante de barragens são pobremente investigados.

**JUSTIFICATIVA**

O teleósteo *P. argenteus* é espécie endêmica da bacia do rio São Francisco que apresenta grande importância econômica regional. Pouco se conhece sobre análises histopatológicas do fígado e baço e dos CMMs dessa espécie, e ainda considerando que cada vez mais os órgãos tem sido considerados importantes marcadores do estado geral de saúde dos animais que pode levar a utilização biomarcador da degradação dos ambientes aquáticos.

## **OBJETIVOS**

## 1. Objetivo Geral

Avaliar sobre os aspectos histopatológicos, moleculares e bioquímicos do fígado e do baço do peixe teleosteo *Prochilodus argenteus*, associando-os a dois diferentes pontos do rio São Francisco na região da represa de Três Marias.

### 1.1. Objetivos específicos

- Obter e comparar os dados biométricos para cálculo do fator de condição (K), e o índice hepatossomático (IHS) de *P. argenteus* coletados nos dois pontos do rio São Francisco.
- Determinar as condições abióticas (temperatura, condutividade, salinidade, turbidez) e químicas (pH, oxigênio dissolvido, dureza) e a concentração de metais (As, Cd, Cu, Mn, Zn) pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica nos sedimento e água dos pontos de coleta.
- Identificar e descrever os possíveis eventos patológicos presentes nos órgãos selecionados para o estudo obtidos de organismos coletados nos dois diferentes pontos do rio São Francisco.
- Analisar a atividade da N-acetil-glicosaminidase (NAG) dos macrófagos presentes nos CMMs do fígado e do baço de *P. argenteus* coletados em diferentes pontos.
- Analisar a expressão do HIF-1 pela técnica de PCR em tempo real em matrizes de fígado de animais coletados nos diferentes pontos do rio São Francisco.
- Caracterizar morfológica e composicionalmente os CMMs e grânulos intracelulares presentes no fígado e baço de *P. argenteus* através de técnicas histoquímicas (PAS, Perls e Von Kossa) comparando-os entre os dois diferentes pontos de coleta.
- Caracterizar a ultra-estrutura dos CMMs do fígado e baço de *P. argenteus* por microscopia eletrônica de transmissão.

- Determinar a composição elementar dos grânulos presentes nos CMMs pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura de rotina (elétrons secundários) e microscopia eletrônica analítica (por elétrons retro-espalhados e microanálise de raios-X).

## **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 1-Área de estudo

Selecionamos baseados na possível diferença de características físico-químicas dois trechos do rio São Francisco próximos à Barragem Hidrelétrica de Três Marias. O primeiro ponto de estudo denominado (JB) foi a cerca de 1Km à jusante da barragem (Figura 2). O outro trecho ponto de coleta foi no mesmo rio após a confluência com o rio Abaeté cerca de 34 Km à jusante da barragem denominado (JA) (Figura 2).

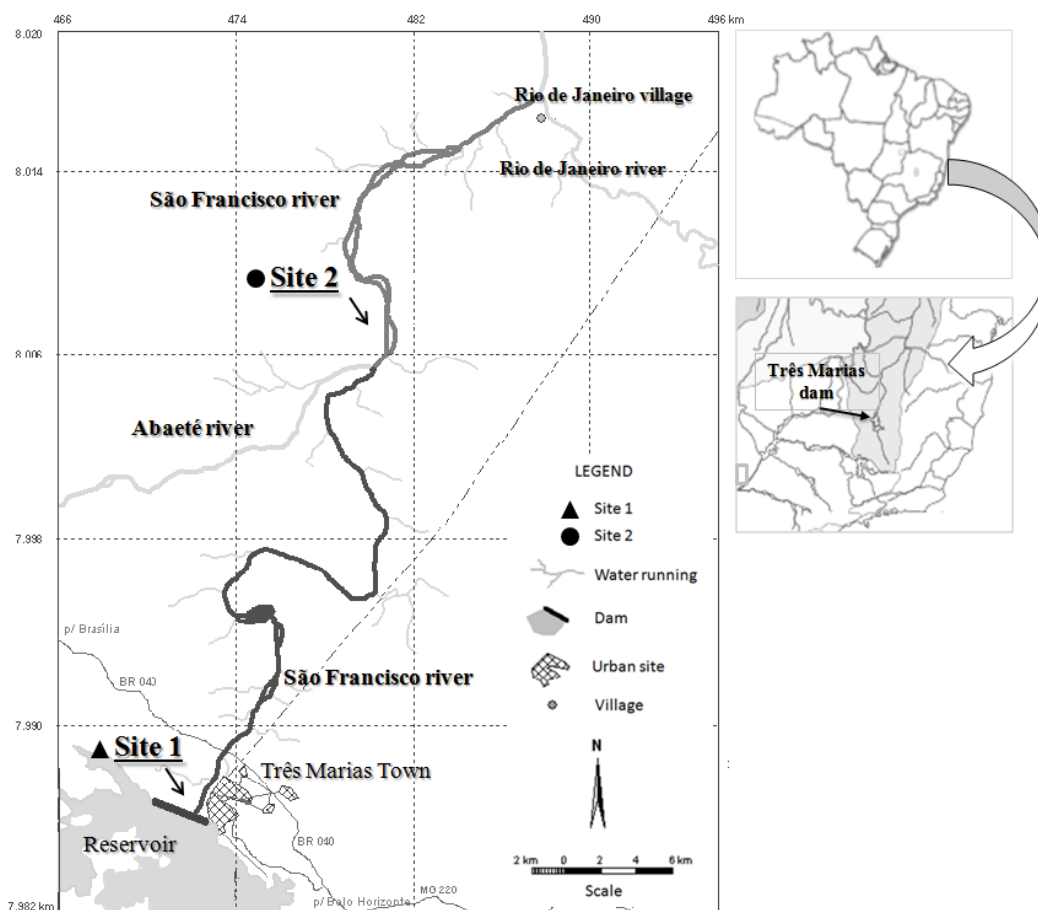


Figura 2. Locais de estudo no rio São Francisco. Os pontos de coleta estão identificados como Site 1 (imediatamente após a jusante da represa de Três Marias- JB) e Site 2 (após a confluência com rio Abaeté- JA).

## 2. Coleta dos espécimes de *Prochilodus argenteus*

Os espécimes foram coletados na estação seca em agosto de 2008. Para o presente estudo foram coletados com auxílio de tarrafas quarenta espécimes de *P. argenteus*. A fim de se descartar uma possível influência relacionada ao sexo e ao ciclo

reprodutivo sobre o tecido hepático, selecionaram-se 10 fêmeas de *P. argenteus* medindo  $37,8 \pm 0,8$  em estágio de repouso gonadal em cada trecho. A determinação do estágio gonadal foi baseada na observação macroscópica das gônadas a fresco e confirmada posteriormente em colaboração com o Laboratório de Ictiohistologia, no qual foram realizadas as análises histológicas segundo Bazzoli (2003).

### **2.1. Determinação dos fatores e dados biométricos**

Para cada um dos 20 animais, foram obtidos os dados biométricos de comprimento total, além dos pesos corporal e hepático. Para avaliar o estado físico dos espécimes de *P. argenteus*, calculou-se o fator de condição de Fulton (K). O valor desse índice foi determinado de acordo com Nikolsky (1963), utilizando-se a seguinte fórmula:  $(K=PC/CT^3 \times 100)$ , onde: PC = Peso corporal (g) e CT = comprimento total (cm).

A fim de se estabelecer possíveis distúrbios relacionados à massa do fígado, calculou-se o índice hepatossomático (IHS). O valor desse índice foi obtido através da fórmula:  $IHS=PF/PC \times 100$  (TAVARES-DIAS et al, 2000), onde PF = peso do fígado (g), PC = peso corporal (g).

### **3. Caracterização dos parâmetros físico-químicos dos pontos de coleta.**

Em cada um dos pontos de coleta (JB e JA) foram determinados três pontos para coleta de água e sedimento (margem direita, meio e margem esquerda).

#### *Análise com sonda multi-parâmetros*

Em cada um dos pontos, três amostragens foram realizadas para a obtenção dos valores de: pH, temperatura, condutividade elétrica (CE), turbidez (T) e oxigênio dissolvido (OD), utilizando-se de uma multi-sonda Horiba U-10. Todos os valores obtidos foram testados estatisticamente pelo Test t, com intervalo de confiança a 95%.

### *Análise por espectrofotometria de absorção atômica*

A determinação da concentração de metais pesados dissolvidos na água foi realizada com a utilização de frascos de polietileno de 500 mL previamente descontaminados em solução 10% de ácido nítrico por 48 horas. Esses recipientes contendo 2 mL de solução de ácido nítrico a 10% foram submergidos na vertical a 10 centímetros da superfície da água e após vedação, mantidos a 10°C. No laboratório as amostras foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm para determinação da presença dos metais As, Cd, Cu, Mn, Zn. A análise foi realizada em 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 µL/L e testados estatisticamente pelo Test t, com intervalo de confiança a 95%.

As amostras de sedimento de fundo foram obtidas utilizando draga mão nos mesmos pontos acima descritos. A lama foi acondicionada em potes de polietileno previamente descontaminados em solução 10% de ácido nítrico por 48 horas. As amostras foram mantidas em geladeira a 10°C até o processamento para espectrofotometria de absorção atômica. As amostras de sedimento foram secas em estufas a 60°C por 24 horas. Após a secagem, as amostras foram trituradas em almofariz de cerâmica e peneiradas em peneira com abertura de 65 µm. Suspensões contendo 10mg foram inseridas diretamente no amostrador automático do equipamento espectrofotômetro de absorção atômica. Da mesma forma que a água, a determinação da presença de metais As, Cd, Cu, Mn, Zn em amostras de sedimentos foram obtidas usando um aparelho para a espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite (GF AAS) Analyst 400 com grafite forno HGA 900 (Perkin Elmer-Norwalk, CT EUA). Os valores foram expressos em mg/Kg e testados estatisticamente pelo Test t, com intervalo de confiança a 95%.

#### **4. Processamento histológico**

Imediatamente após a captura, os animais foram selecionados e sacrificados via transecção cranial com tesoura cirúrgica, a cavidade celomática foi aberta e o fígado e o

baço foram removidos. Fragmentos hepáticos e esplênicos foram fixados por imersão em líquido de Bouin e, após 24 horas foram mantidos em álcool a 70% e processados segundo técnica de rotina para inclusão em parafina. Os blocos foram seccionados a 6µm de espessura obtendo-se cortes não seriados em diferentes profundidades do tecido.

As lâminas com os cortes foram seqüencialmente coradas pelos seguintes métodos: a) Hematoxilina-Eosina (HE) (BEHMER et al, 1976); b) Ácido Periódico de Schiff - PAS (BEHMER et al, 1976), para identificação de glicoproteínas neutras; c) Perls, para identificação de grânulos contendo melanina, hemossiderina e lipofuscina (BLAZER 2002); d) Von Kossa para identificação de sais de cálcio. (LUNA, 1968).

Os resultados histológicos foram registrados com a obtenção de imagens digitais adquiridas no microscópio óptico modelo Olympus BX41 acoplado a uma câmara digital Olympus Q Color no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do ICB–UFMG. Para obtenção das imagens da área total do tecido hepático utilizou-se objetiva de 2,5 X com projetiva também de 2,5 X. As demais imagens foram adquiridas com objetiva de 10 X, 20 X e 40 X e 100 X e projetiva de 3 X. A digitalização das imagens foi feita juntamente com lâmina micrometrada Olympus 0,01mm para calibração.

## **5. Caracterização morfológica e histopatológica**

Cortes corados em HE foram analisados ao microscópio de luz a fim de se determinar a citoarquitetura, os tipos celulares, as estruturas histológicas e as possíveis lesões presentes no fígado e baço de *P. argenteus* oriundos dos dois pontos. Para amostras de HE, três níveis de alterações (semelhante ao procedimento descrito por Melo et al, 2008) foram aplicados para determinar a intensidade das características tais como: deslocamento nuclear, vacuolização citoplasmática, hiperemia da citoplasmática, ocorrência de grânulos contendo pigmento e áreas de necrose. Para todos os itens estudados, dez campos de cada lâmina histológica foram selecionados aleatoriamente. A objetiva de 40x foi usada para identificar deslocamento nuclear, vacuolização citoplasmática, presença de grânulos citoplasmáticos e áreas de necrose, enquanto a objetiva de 10x foi utilizada para a análise de hiperemia.

De acordo com a intensidade de ocorrência, os parâmetros foram considerados como: baixa ocorrência - quando não houve alterações; média ocorrência - quando as

alterações foram observadas em menos de 50% da área analisada, e alta ocorrência - quando as alterações foram observadas em mais de 50% da área. Para os grânulos citoplasmáticos, a ocorrência foi classificada como: baixa ocorrência - quando não havia grânulo visível por um núcleo de hepatócito no campo; média ocorrência - quando havia menos de três grânulos visíveis por núcleo de hepatócito e elevada ocorrência - quando mais de três grânulos eram observados por núcleos de hepatócitos.

## **6. Caracterização morfométrica dos CMMs**

Foram utilizadas imagens digitais de uma lâmina corada pela histoquímica de Perls de cada fígado e baço por animal. Em cada lâmina foram escolhidos aleatoriamente 10 campos totalizando uma área de 58,45 mm<sup>2</sup> em cada órgão. As áreas ocupadas pelos CMM foram adquiridas com objetiva de 40 X e projetiva de 3X. A digitalização das imagens também foi feita juntamente com lâmina micrometrada Olympus 0,01mm para calibração.

As imagens digitalizadas foram mensuradas com auxílio do software analisador de imagens Image Pro Plus obtendo-se: a) Número de CMMs por mm<sup>2</sup>; b) Área total ocupadas por CMMs (mm<sup>2</sup>); c) número médio de CMMs. A partir da obtenção dos valores absolutos calculou-se também: c) distribuição de frequência relativa à área dos CMMs presentes no fígado e no baço; d) Os resultados foram expressos em valor médio e agrupados por trecho de coleta (JB e JA) ± erro padrão e testados estatisticamente pelo método não paramétrico de Mann-Whitney (PAGANO, 1990; GLANTZ, 1992) com intervalo de confiança a 95% utilizando o programa computacional *GraphPad Prism*.

## **7- Morfometria da área dos grânulos dos CMMs.**

Antes de realizar as medidas de área ocupada por cada tipo de grânulo dentro dos CMMs utilizando lamina coradas pela técnica de Perls, foram realizados ensaios para a confirmação da característica de distribuição dos pigmentos de lipofuscina e melanina. Cortes seriados foram corados seqüencialmente para as técnicas histoquímicas de Perls, Aldeído-fucsina e Masson Fontana para a confirmação de que as áreas são correspondentes as obtidas pela técnica de Perls (Luna, 1968, Blazer 2002).

Imagens digitalizadas de cinco CMMs de cada animal do fígado e baço foram selecionadas, segmentadas onde cores distintas foram atribuídas a cada uma das

diferentes marcações dos grânulos nos CMMs (melanina, hemossiderina e lipofuscina), e analisadas com o auxílio do programa computacional Image Pro Plus. A área relativa a cada cor (em mm<sup>2</sup>) foi subtraída da área do respectivo CMM (em mm<sup>2</sup>), obtendo-se o percentual ocupado pelos grânulos e também pelas áreas que não continham grânulos. De modo similar os resultados foram expressos em valor médio  $\pm$  erro padrão, e testados estatisticamente pelo método não paramétrico de Mann-Whitney com intervalo de confiança a 95% (PAGANO, 1990; GLANTZ, 1992).

## **8. Microscopia eletrônica de transmissão - MET**

Fragmentos do fígado e baço de *P. argenteus* foram fixados em glutaraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio pH 7,4 e 0,1 M, in loco por 4 horas. Após fixação os espécimes foram acondicionados em tampão cacodilato de sódio pH 7,4 e 0,2 M, refrigerados a 6°C e acondicionados para o transporte em caixas de isopor refrigerada a 4°C. O processamento do material foi realizado no Laboratório do Estudo da Interação Químico-Biológica e da Reprodução Animal (LIQBRA), no Departamento de Morfologia do ICB, UFMG.

As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% durante 1 hora em câmara escura e lavadas no mesmo tampão cacodilato. Em seguida, procedeu-se a desidratação em concentrações crescentes de acetona Sigma (50%, 70%, 95%, 100%) e o emblocamento em resina Polybed 812. Após polimerização por 48 horas a 60°C os blocos foram piramidados e seccionados no ultra micrótomo LKB obtendo-se cortes semi-finos com 0,2  $\mu$ m de espessura, os quais foram corados em azul de toluidina para a orientação dos cortes ultrafinos. Posteriormente, obtiveram-se cortes ultrafinos a 80 nm de espessura que foram contrastados com soluções de acetato de uranila e citrato de chumbo e observados e fotografados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss-EM10 a 80 keV. Após a revelação os negativos obtidos foram digitalizados no scanner *EPSON PERFECTON 4990* com Resolução de 1200x1200 dpi.

## **9. Microscopia analítica e microanálise de raios-x**

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), amostras foram fixadas em líquido de Carnoy contendo 1% de Na<sub>2</sub>S e criopreservados em soluções de sacarose a

10% e 20% por 2 horas e em 30% “overnight”. Os materiais foram incluídos em um adesivo líquido para congelamento (Tissue-Tek ®) e mantidos a -80°C. Os blocos foram seccionados a 10 µm espessura em criostato Leica CM185. As seções foram montadas em lamínulas de carbono (Thermanox ®), recongeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas por 6 horas sob vácuo de  $100 \times 10^{-3}$  mbar a -56°C usando um liofilizador (Labconco). Então, os cortes foram metalizados com carbono em um evaporador (Hitachi modelo HUS4G) e analisados por MEV com elétrons secundários, elétrons retroespalhados e microanálise de raios-X em um microscópio FEG Quanta 200 (FEI) do Centro de microscopia Eletrônica da UFMG.

## **10. Quantificação do acúmulo de macrófagos nos tecidos por determinação da atividade de N-acetyl-glicosaminidase**

A quantificação macrófagica nos tecidos foi medida, adaptada de Russo et al (2010), mediante a atividade de N-acetyl-glicosaminidase (NAG). A atividade foi medida em amostras homogeneizadas de fígado e baço utilizando 100 mg de tecido homogeneizados em 2 mL de solução salina (0,9%) contendo 0,1% (v/v) de Triton X-100, e centrifugados a 4°C por 10 min a 1500 g. Os sobrenadantes foram utilizados para o ensaio de NAG. A reação foi iniciada a 37 °C por 10 min em microplacas de 96 poços pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-D-glucosaminide 0,1 M (Sigma) em tampão citrato / fosfato (ácido cítrico, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4,5), em uma concentração final de 2,24 mM, a 100 µL do sobrenadante da amostra de tecido processado diluído no mesmo tampão. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6), e a absorbância foi lida a 405 nm em espectrofotômetro (Emax, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em absorbância relativa a 100 mg de tecido. Os ensaios realizados NAG sob essas condições foram específicos para macrófagos.

## **11. Expressão de HIF-1**

### **11.1. Extração do RNA total**

As amostras foram homogeneizadas e o RNA extraído através do método do Trizol®. Neste método, o fragmento de fígado ainda congelado foi macerado, sendo

adicionado 1mL de Trizol até obtenção de consistência líquida. Em seguida, foram adicionados 200µL de clorofórmio, e após a homogeneização, foram centrifugados a 4°C por 15 min a 13200 rpm. Foi utilizada a fração sobrenadante transparente, correspondente à fração contendo RNA. Adicionaram-se-se 500µL de isopropanol, à amostra que foi acondicionada a -20°C. Após 24 horas, o tubo foi centrifugado a 4°C por 20 min a 13200 rpm. O sobrenadante foi excluído, e adicionado ao pellet 1mL de etanol 75%, e o mesmo foi centrifugando a 4°C por 5 min a 13200rpm. O sobrenadante foi novamente retirado e o pellet residual (correspondente ao RNA) permaneceu em temperatura ambiente por aproximadamente 15 min. Em seguida adicionaram-se 50µL de água-DEPC e os tubos foram armazenados em freezer a -80 °C.

Para a quantificação utilizou-se uma alíquota de 1 µL, que foi submetida à leitura da densidade óptica (O. D.) no aparelho Nanodrop 2000C (Thermo Scientific).

## 11.2. Iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os genes alvo HIF-1 e GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), designados para a transcrição reversa e PCR em tempo real foram por nós estudados e selecionados com base na análise da seqüência descrita no GeneBank, obtida através do Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As seqüências foram posteriormente analisadas através do site da empresa IDT – Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com>) para a elaboração dos iniciadores para as regiões alvo de cada gene de acordo com as nossas especificações para as condições de cada iniciador.

Os primers para RT-PCR foram baseados em seqüência de DNA HIF-1a do peixe teleósteo *Danio rerio* (GenBank™). A região alvo para PCR foi composta de 103 pares de base e seqüência 5'- TTG TTC TCC AAG GGT CAG GTG TGT -3' e seqüência reversa 5'- TGC TGT TGT AGA GGA CAG TGG CTT -3'.

## 11.3. Transcrição reversa (RT)

A transcrição reversa foi realizada utilizando-se a GenScript Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase, a partir de uma quantidade de RNA total inicial de 30 ng/µL da reação de transcrição reversa.



#### 11.4. Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (PCR em tempo real)

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real realizada no equipamento de Sistema de PCR em tempo real ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System, utilizando-se o SYBR Green PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Contem: Marcador SYBR Green 1, AmpliTaq Gold DNA Polimerase, dNTPs (com dUTP), Referência Passiva 1, Tampão otimizado) que contém todos os componentes necessários para a reação de PCR em tempo real.

As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em duplicata, em um volume final de reação de 20 µL. Em cada placa avaliaram-se 2 genes alvos, sendo que um deles sempre era o gene de referência GAPDH como normalizador. Em cada poço foram pipetados 5 µL de amostra, e adicionados posteriormente 15 µL do Mix contendo 10 µL do SYBR Green PCR Master Mix Kit, 1,5 µL de cada iniciador (senso e anti-senso) (1,5 pmol/cada). A placa foi então selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), a qual foi submetida a um spin para trazer todo o volume para o fundo do poço. Em seguida a placa foi encaixada no equipamento de PCR em tempo real dando-se início à leitura. Durante todo o processo foram utilizadas luvas, máscara, ponteiros com barreira, e toda a pipetagem foi realizada em capela de fluxo para evitar contaminação.

As reações de PCR em tempo real ocorreram no ciclo termal definido após o desenho dos primers. Ao término da ciclagem foi realizada a curva “de melting” a 60°C por 1 minuto, para a construção da curva de dissociação, que tem por objetivo determinar a especificidade dos fragmentos amplificados.

#### 11.5. Análise estatística

O Teste t não pareado foi utilizado para avaliar a expressão dos transcritos dos genes-alvo, comparando o grupo controle com o grupo exposto. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ , utilizando-se programa

computacional GraphPad Prism 5. Os resultados normalizados foram expressos pelo  $\Delta\text{CT}$  do gene alvo -  $\Delta\text{CT}$  do normalizador (GAPDH) para os genes-alvo.

## **RESULTADOS**

A síntese de parte dos resultados encontra-se condensada em dois artigos em processo de submissão.

Artigo I: Intitulado “**Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus***”. DOI: 10.1007/s00441-011-1286-3 a ser publicado na revista Cell and Tissue Research (Anexo I).

Artigo II: Em processo final de submissão. Intitulado “**Environment influences on *Prochilodus argenteus* liver collected from São Francisco river, Brazil**” a ser submetido a revista Journal of Fish Disease (Anexo II).

### 1. Animais, biometria e índices somáticos.

Os animais analisados não apresentaram diferença no peso corporal e comprimento total igual entre os dois trechos de estudo (JB e JA).

Os valores médios do índice hepatossômico (IHS) e do fator de condição de Fulton (K) de todos os animais analisados ( $\pm$  erro padrão) foram respectivamente  $0,47 \pm 0,09$  e  $1,28 \pm 0,09$ . Estatisticamente, o IHS não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Figura 3a). No entanto o fator K dos animais coletados no trecho JA apresentou diferença significativa em relação aos espécimes derivados do trecho JB. ( $p < 0,05$ ) (Figura 3b).

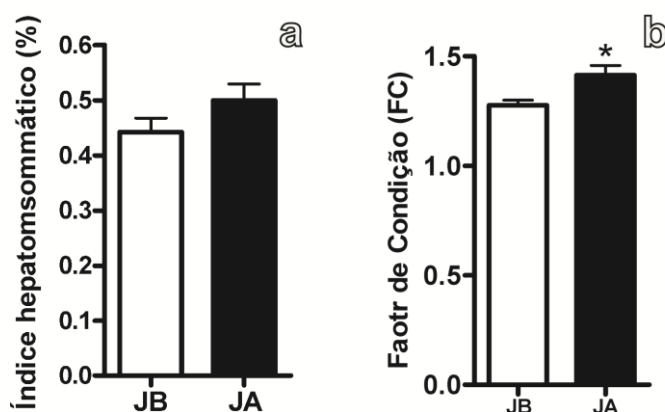


Figura 3. Gráfico mostrando os índices somáticos dos animais capturados nos diferentes trechos de coleta. Em **a** índice e hepatossômico (IHS) dos animais provenientes dos dois trechos de estudo. Observar em: **b** o Fator de Condição de Fulton (K) dos animais capturados em JB e JA. (\*) Diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 2. Parâmetros físico-químicos da água

Os valores de oxigênio dissolvido, pH, temperatura e foram menores em JB quando comparados com JA. Ao mesmo tempo valores para turbidez e condutividade elétrica foram menores em JA. Os valores foram expressos em média e erro padrão (Figura 4).

|           | pH          | Temperatura  | Oxigenio dissolvido | Turbidez     | Condutividade |
|-----------|-------------|--------------|---------------------|--------------|---------------|
| <b>JB</b> | 6.16 ± 0.06 | 22.9 ± 0.06  | 8.1 ± 0.05          | 6.9 ± 3.0    | 21.4 ± 6.7*   |
| <b>JA</b> | 6.6 ± 0.08* | 23.3 ± 0.25* | 8.7 ± 0.04*         | 44.9 ± 17.6* | 5.7 ± 0.17    |

Figura 4. Valores dos parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, oxigênio dissolvido, turbidez e condutividade) nos dois pontos estudados. (\*) Indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 3. Metais na água e sedimentos

Por meio de análises de espectrofotometria de absorção atômica as concentrações dos metais (As, Cd Zn, Cu, Mn) foram estabelecidas em água e sedimento. Em amostras de água coletadas em JB foi observada maior concentração de Cd, Mn e Zn quando comparada com JA. Os valores foram expressos em  $\mu\text{L/L}$ . Da mesma forma em amostras de sedimento, maiores valores foram encontrados para As, Cd e Cu nas amostras de JB. Esses valores são apresentados em  $\text{mg/Kg}$  (Figura 5).

|                  |           | As           | Cd           | Cu         | Mn             | Zn             |
|------------------|-----------|--------------|--------------|------------|----------------|----------------|
| <b>Água</b>      | <b>JB</b> | nd           | 2.99 ± 0.7 * | nd         | 213.6 ± 25.9 * | 101.1 ± 2.14 * |
|                  | <b>JA</b> | nd           | nd           | nd         | 139.1 ± 1.85   | 16.7 ± 1,49    |
| <b>Sedimento</b> | <b>JB</b> | 50.4 ± 3.4 * | 5.15 ± 1.6 * | 11.6 ± 1.7 | 36.1 ± 12.4    | nd             |
|                  | <b>JA</b> | 18.2 ± 1.2   | 0.62 ± 0.25  | 5.58 ± 0.3 | 45 ± 8.8       | nd             |

Figura 5. Valores das concentrações de metais na água ( $\mu\text{L/L}$ ) e sedimento ( $\text{mg/Kg}$ ) entre os dois pontos estudados. (\*) Indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ), (nd) não detectado.

#### 4. Histologia e análise histopatológica

O fígado de *P. argenteus* apresentou-se tri-lobado. Externamente o órgão erarevestido por fina cápsula conjuntiva (Figura 6a), contudo esta não projetou septos através do parênquima não caracterizando, assim, a presença de lóbulos hepáticos.

O parênquima do fígado de *P. argenteus* apresenta parênquima com hepatócitos organizados sob a forma de tubos anastomosados cujas paredes são compostas de duas a três camadas celulares delimitadas por capilares sinusóides estreitos, descontínuos e tortuosos. De modo geral os hepatócitos apresentam forma poliédrica com citoplasma fracamente basofílico com presença de grânulos intracitoplasmáticos (GI) aleatoriamente distribuídos através do citoplasma (Figura 6a). Entre os espécimes analisados os GI variam em sua forma e tamanho não apresentando afinidade distinta aos corantes ácido-básicos, apresentando uma coloração amarelo-acastanhada característica quando corados pela técnica de HE. Preferencialmente os hepatócitos apresentaram núcleos singulares, centrais, esféricos com cromatina e nucléolo evidente (Figura 6a).

Nos animais coletados no ponto JB, os hepatócitos apresentaram vacuolização do citoplasma em graus diferentes, sugerindo tumefação turva e degeneração hidrópica associados a angiectasia e hiperemia (Figura 6b), hepatite (Figura 6c) e necrose (Figura 6d). Nos animais coletados em JA os hepatócitos mostraram frequentemente núcleo central típico, citoplasma moderadamente basofílico sem vacuolização, contendo freqüentes grânulos intracitoplasmáticos de forma irregular (Figura 6a). Uma avaliação semi-quantitativa das alterações acima descritas mostrou claramente que o fígado dos animais coletados em JB foram mais afetados do que os animais coletados em JA (Figura 7).

Os baço dos animais de ambos trechos de estudo não apresentaram lesões aparentes, cujo parênquima se mostrou com alto grau de preservação de sua citoarquitetura: limites nítidos entre a polpa branca e polpa vermelha não são observados no baço da espécie *P. argenteus*.

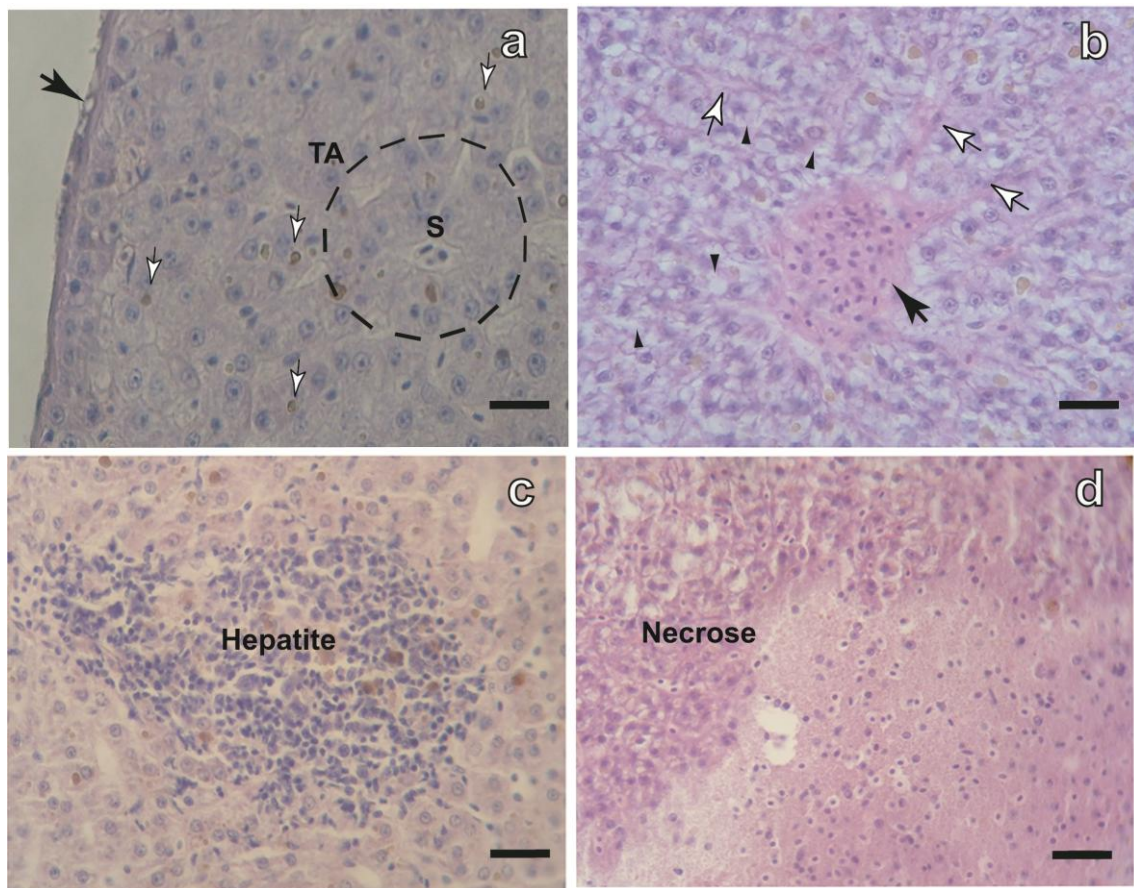


Figura 6. Micrografias de luz do fígado de *Prochilodus argenteus* coletadas em JA (a) e JB (b, c e d). Note em a cápsula conjuntiva (seta preta), hepatócitos em arranjo tubular anastomosado (TA) atravessado por capilar sinusóide (S). Observe a ocorrência IHG (setas brancas) no interior dos hepatócitos. Em b, observe angiectasia e hiperemia no vaso sangüíneo (seta preta) e em capilares sinusóides (setas brancas). Tumefação turva e degeneração hidrópica (cabeças de setas), e ausência de (IHG), também são observados. Em c a presença de hepatite e extensas áreas com aspecto liquefeito basofílico, caracterizando a presença de necrose são observadas em d. Hematoxilina-eosina. Barra = 16,2  $\mu$ m.

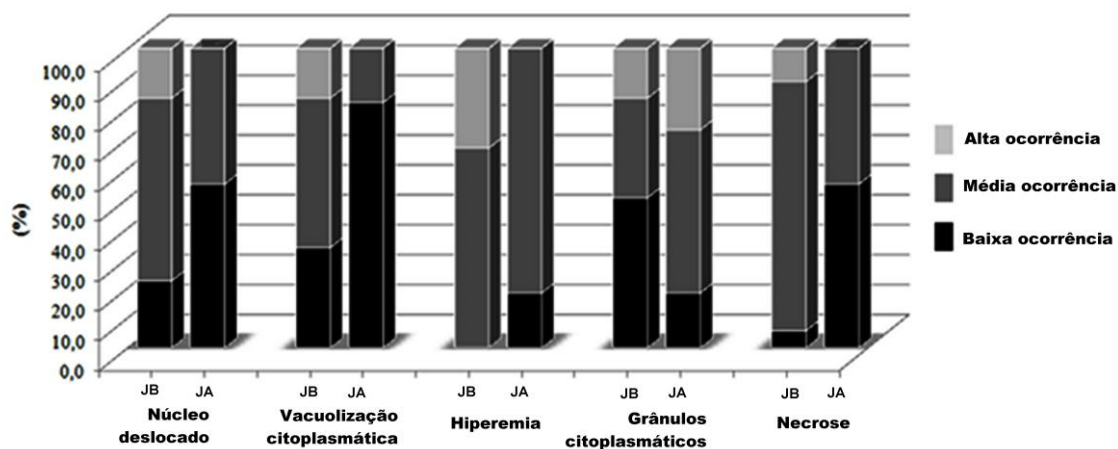


Figura 7. Percentual de ocorrência das alterações morfológicas no fígado de *Prochilodus argenteus* nos dois locais de coleta.

### 5. Análise histoquímica dos CMMs.

A análise do material pelas técnicas histoquímicas de PAS, Perls e von Kossa histoquímica nas amostras de fígado de *P. argenteus* permitiu a caracterização da distribuição de carboidratos neutros, hemossiderina, lipofuscina e sais de cálcio nos CMMs. A histoquímica de PAS mostrou depósitos PAS-positivos em hepatócitos e nos CMMs. Nos animais de JB a marcação para PAS se restringiu aos CMMs (Figura 8a), e com menor intensidade que nos animais de JA, cuja marcação também foi observada nos ICG dos hepatócitos (Figura 8b).

Os cortes reagidos pela técnica de Perls apontaram para a presença de hemossiderina (corada em azul) e lipofuscina (coloração amarelada) nos IHG e nos grânulos dos CMMs. A presença de melanina, identificada pela coloração em negro, mostrou-se ausentes nos hepatócitos e escassa nos CMMs.

Entre os animais analisados observou-se diferença na composição dos grânulos dos CMMs. Nos animais coletados no trecho JB observou-se nítida prevalência de lipofuscina associada aos grânulos (Figura 8d). Por outro lado, nos animais coletados no trecho JA, a hemossiderina foi majoritária, acompanhada de marcações para lipofuscina e melanina (Figuras 8c).



A presença de sais de cálcio nos grânulos dos hepatócitos e CMM dos animais analisados foi confirmada pela técnica histoquímica de von Kossa. De forma similar foram observadas variações entre espécimes provenientes dos dois diferentes trechos de coleta. A presença de cálcio nos hepatócitos foi discreta, por outro lado, os CMMs apresentaram maior intensidade de marcação, mas não sendo observadas variações entre os animais dos diferentes trechos (figura 8e).

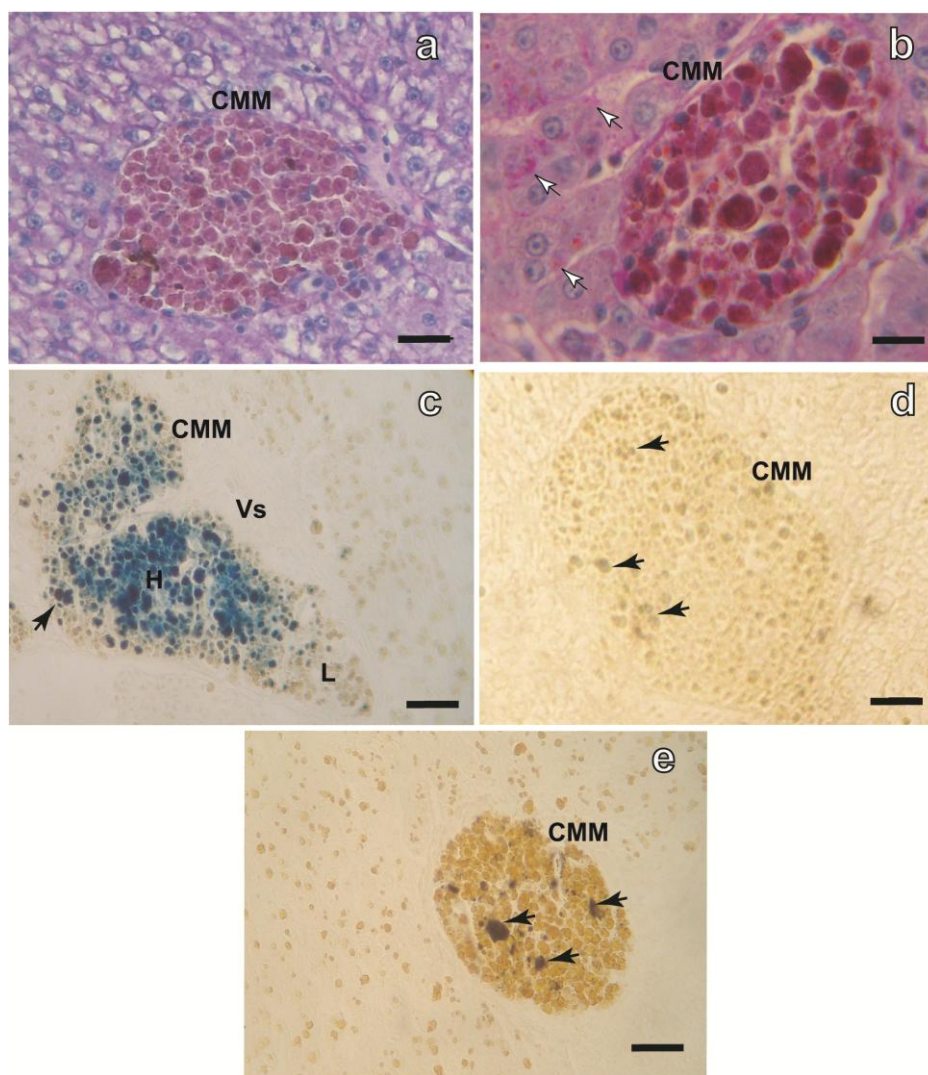


Figura 8. Micrografias luz de diferentes técnicas histoquímicas utilizadas no fígado *Prochilodus argenteus*. Note (a d, e JB), b e c JA Em a histoquímica do PAS, mostrando hepatócitos vacuolizados sem marcação para PAS. Observe ainda CMM PAS-positivo. Em b, depósitos citoplasmáticos com marcação para PAS (seta). Em c, a técnica Perls mostrando marcação para melanina (seta), hemosiderina (H) e lipofuscina (L) em no CMM. Note em d, predominância de lipofuscina no CMM (seta). Observe em e, técnica de von Kossa mostrando presença de cálcio nos CMMs (setas). a barra = 16,2  $\mu\text{m}$ ; b, c, d e e, barra = 6,8  $\mu\text{m}$ .

Entre os diferentes órgãos foi observada diferença na morfologia e composição dos grânulos dos CMMs. Morfologicamente os CMM presentes no fígado eram mais regulares enquanto os presentes no baço apresentavam-se mais pleomórficos (Figuras 8f e 8g). Grânulos de hemossiderina foram mais frequentemente observados nos CMMs do fígado do que do baço. Nos CMMs presentes no baço constatou-se a predominância de grânulos contendo lipofuscina além de maior ocorrência de melanina quando comparado com os CMMs encontrados no fígado (Figuras 8f e 8g).

A fim de se confirmar a presença dos três tipos de pigmentos, conduziram-se novas técnicas histoquímicas, como Aldeído-fucsina (Luna, 1968) para confirmação da presença da lipofuscina e Masson Fontana (Luna, 1968) objetivando confirmar a presença de melanina nos CMMs dos diferentes órgãos. Corroborando os achados pela técnica de Perls, nos CMMs dos diferentes órgãos a histoquímica de Aldeído-fucsina apontou para a presença de lipofuscina nos mesmos grânulos anteriormente evidenciados na histoquímica de Perls. Similarmente, a técnica de Masson Fontana demonstrou a mesmo aspecto para melanina demonstrada pela técnica de Perls (Figuras 9a, 9b, 9c, 9d, 9e e 9f).

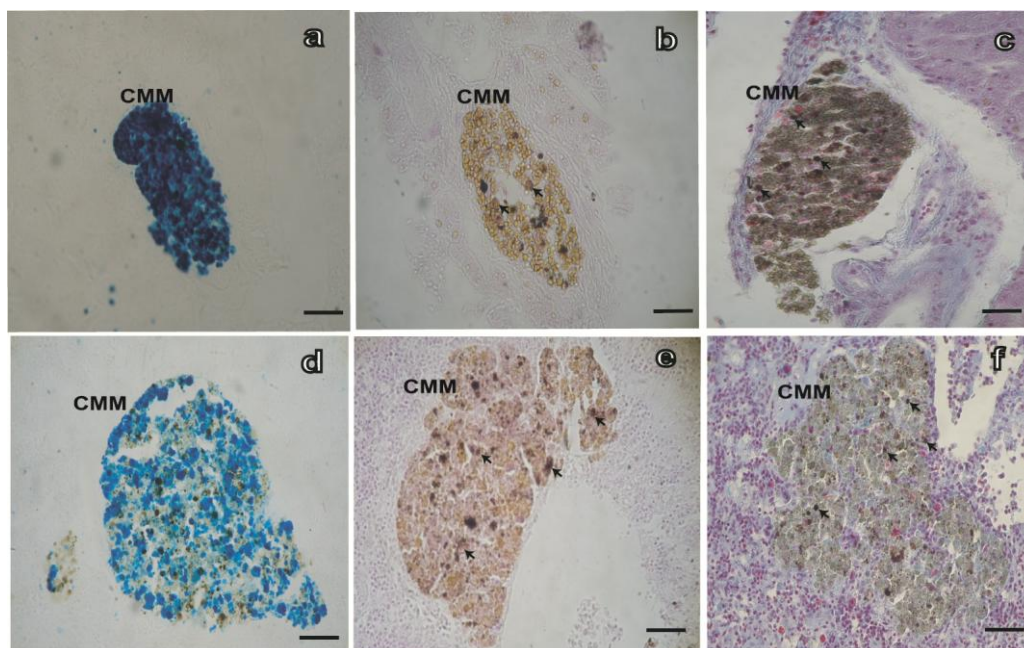


Figura 9. Micrografias de luz de fígado (**a, b e c**) e baço (**d, e e f**), coradas por diferentes técnicas histoquímicas. Note em **a e d**, corte corado pela técnica de Perls identificando principalmente grânulos contendo hemossiderina corados em azul. Em **b e e**, secções coradas pela histoquímica de Aldeído-fucsina confirmando a presença de grânulos contendo lipofuscina (setas). Observe em **c e f** técnica de Masson Fontana atestando a presença de melanina (setas) Barras = 17µm.

## 6. Análises morfométricas

Em relação a quantidade de CMMs por órgão, houve um número significativamente maior no fígado do que no baço (Figura 10). A distribuição da área dos CMMs no fígado e baço variou entre 1000-34000  $\mu\text{m}^2$  e 1000-32000  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente (Figuras 11a e 11b). A diferença marcante entre os CMMs do fígado e baço foi a distribuição dos grânulos contendo pigmentos. No fígado os CMMs foram caracterizados por uma alta concentração de hemossiderina quando comparado com o baço. Estes também continha uma quantidade considerável de lipofuscina, mas uma pequena quantidade de melanina. Por outro lado os CMMs presentes no baço apresentaram uma prevalência de áreas que não continha grânulos, e uma maior quantidade de melanina quando comparado com os CMMs observados fígado (Figura 12).

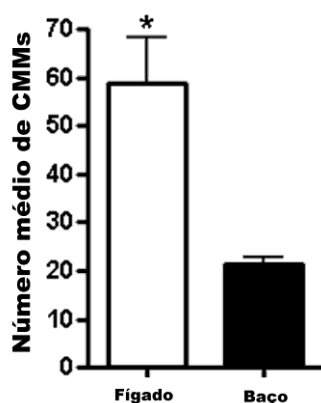


Figura 10. Número de CMMs na mesma área analisada do fígado e no baço de *Prochilodus argenteus* (\*  $p < 0,05$ )

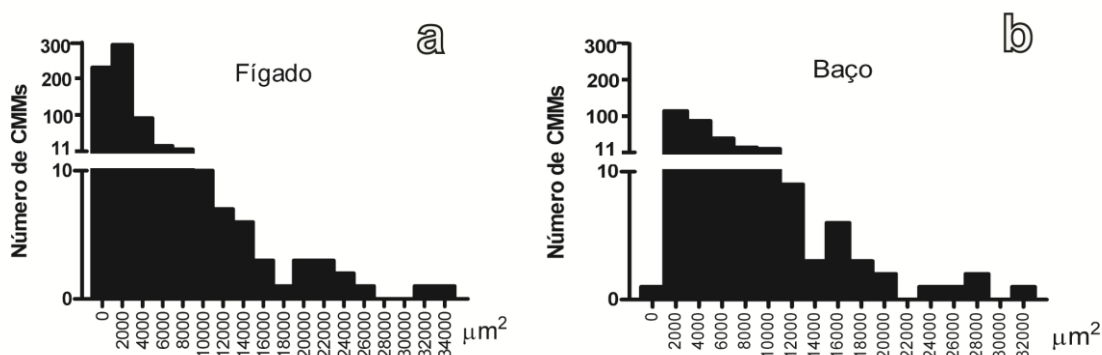


Figura 11. Distribuição de freqüência da área dos CMMs no fígado (a) e baço (b) de *Prochilodus argenteus*.

Entretanto não houve diferença significativa entre os trechos JA e JB, exceto para o fígado, com relação aos centros que apresentaram diâmetro superior a  $0,01\text{mm}^2$  (Figura 12)

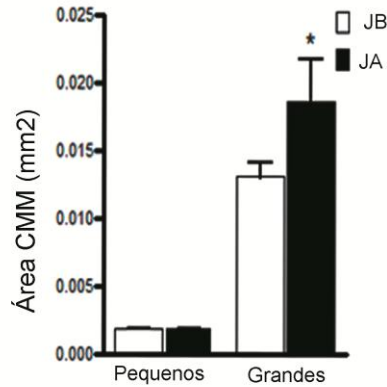


Figura 12. Gráfico mostrando a distribuição de CMM pequenos e grandes entre os dois pontos de estudo, (\*  $p < 0,05$ )

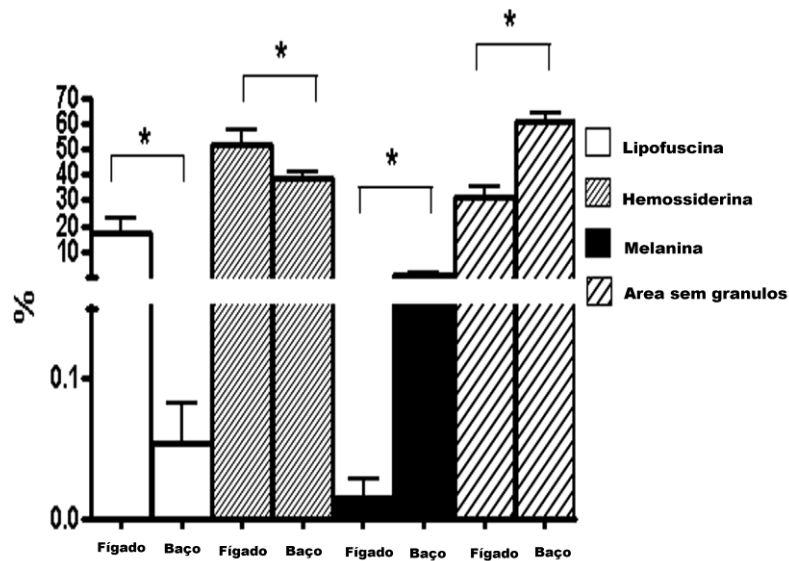


Figura 13. Histograma mostrando o percentual de áreas ocupadas por cada tipo de pigmento (lipofuscina, hemossiderina, e melanina) e também áreas sem grânulos nos CMMs do fígado e do baço de *Prochilodus argenteus* (\*  $p < 0,05$ ).

## 7. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Da mesma forma que os achados de ML, diferenças importantes no fígado foram observadas entre os animais dos dois locais de estudo. Nos animais coletados em

JB, dados da ultra-estrutura mostraram hepatócitos apresentando citoplasma com aspecto liquefeito associado à presença de água, sugerindo edema celular (Figura 14a). Nestes mesmos animais observamos a presença de corpos mielínicos e retículo endoplasmático rugoso apresentado cisternas dilatadas, acompanhados de mitocôndrias dilatadas, com ruptura de suas cristas mitocondriais e concreções (Figura 14b). Em contrapartida nos animais coletados em JA, os hepatócitos apresentaram núcleo e heterocromatina periférica (Figura 14c). Nesses animais a rede de retículo endoplasmático rugoso apresentou cisternas íntegras, com mitocôndrias preservadas e grande quantidade de grânulos de glicogênio, sugerindo alto grau de preservação ultra-estrutural (Figura 14d).

Dados de MET dos CMMs revelaram diferenças marcantes no fígado e o baço de *P. argenteus*. No CMMs do fígado o principal tipo celular observado foi macrófagos com núcleos pleomórficos e citoplasma rico em grânulos elétron-densos heterogêneos (Figura 15a). Estes grânulos apresentavam grandes áreas contendo particulados típicos de ferritina. Também foram observados nesses grânulos áreas que continham material hidrofóbico similares a produtos de degradação de membrana além de membranas empilhadas (Figura 15b). Uma estreita associação física entre um eritrócito e um macrófago também foi observada nesse CMM do fígado, indicando um processo de fagocitose (Figura 15c).

As características ultra-estruturais dos CMMs do baço permitiram observar que de forma similar aos CMMs do fígado, os macrófagos também foram o principal tipo celular observado. No entanto, alguns leucócitos, como linfócitos e granulócitos, foram observados. Ao contrário do CMMs do fígado, no baço os macrófagos exibiram uma menor quantidade de grânulos elétron-densos (Figura 16a). Outra diferença marcante foi a estreita associação física entre macrófagos e linfócitos observada nos CMMs do baço, sugerindo o envolvimento desses CMMs em processos de apresentação de antígenos (Figura 16c). A ultra-estrutura dos CMMs esplênicos também apontou para diferenças quando comparada com fígado. No baço foram observados pigmentos isolados de melanina e nos grânulos, grandes áreas contendo materiais hidrofóbicos típicos de lipofuscina associadas a pequenos depósitos típicos de ferritina (Figura 16b). Essas diferenças sugerem vias metabólicas distintas entre os CMMs do fígado e do baço.

A fim de confirmar a presença de ferro nos particulados típicos de ferritina observados nos grânulos dos CMMs do fígado, uma grade contendo cortes de fígado foi levada ao microscópio de transmissão operado com voltagem de 200 keV com detector

EDS acoplado. Um particulado típico no interior do grânulo do CMM hepático foi analisado, confirmando a presença de ferro (Figuras 17a, 17b e 17c)

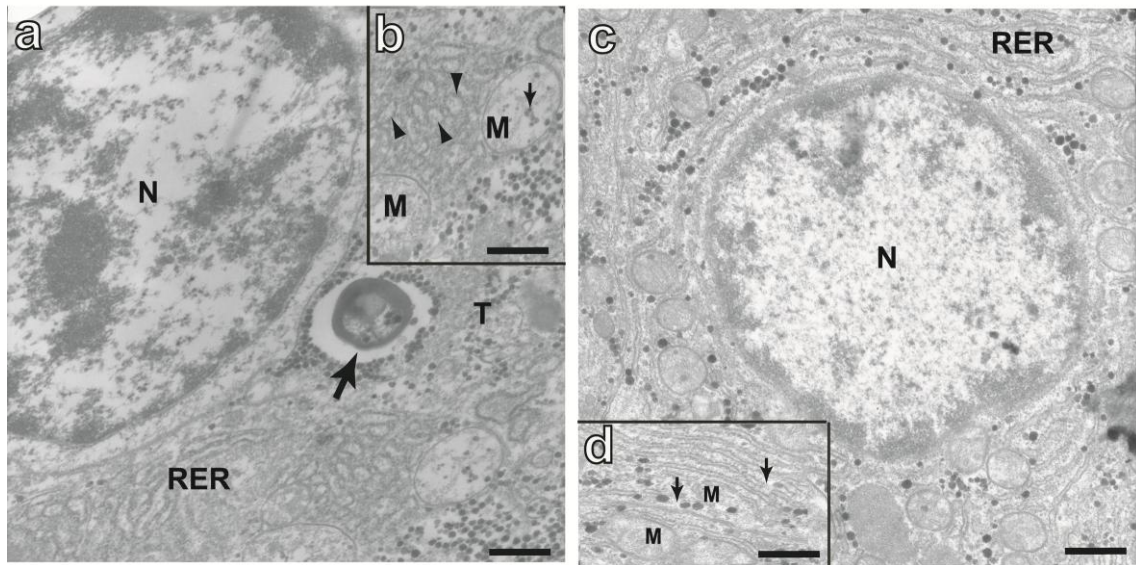


Figura 14. Eletromicrografias de hepatócitos de *P. argenteus*. Em **a** hepatócito de animal coletado em JB. Observe núcleo (N) e citoplasma apresentando aspecto tumefeito (T), indicando o processo de degeneração hidrópica. Note a presença de corpo mielínico (seta). Em **b**, observe mitocôndrias (M) dilatadas com desorganização das cristas mitocondriais e flocculação (seta). Note também dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (cabeças de setas). Em **c**, micrografia eletrônica de um hepatócito de animal coletado em JA. Observe citoplasma íntegro acompanhado de retículo endoplasmático rugoso (RER) na região perinuclear com aspecto normal, além de grande quantidade de glicogênio em preto. No detalhe em **d**, mitocôndrias esféricas (M) e RER com preservação de suas cisternas. **a e c**, barra = 0,2 $\mu$ m; **b e d** barra= 0,11 $\mu$ m.

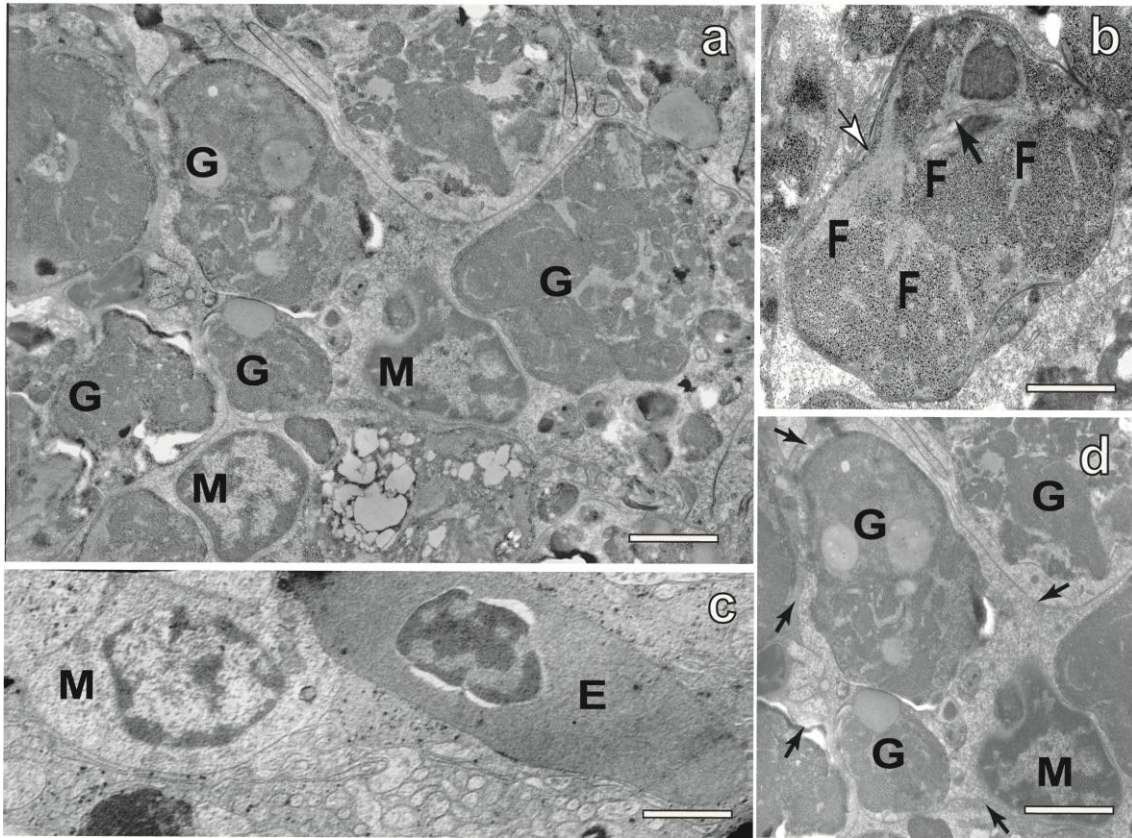


Figura 15. Eletromicrografias de CMMs do fígado. Em **a** observe núcleos de macrófagos (M) e vários grânulos elétron-densos intracitoplasmáticos (G). Em **b** detalhe de um grânulo exibindo uma grande área de pequenos particulados elétron-densos típicos de agregados de ferritina (F). Membranas empilhadas (seta preta) e produtos de degradação lipídica (seta branca) também são vistos. Uma estreita associação física entre um eritrócito e um macrófago é observada em **c**. Em detalhe em **d** a presença de membrana delimitado um macrófago (setas) e exibindo grânulo no citoplasmático característico. **a** barra= 1  $\mu$ m; **b** = 0,1  $\mu$ m; **c**= 0,9  $\mu$ m e **d**=0,2 $\mu$ m.

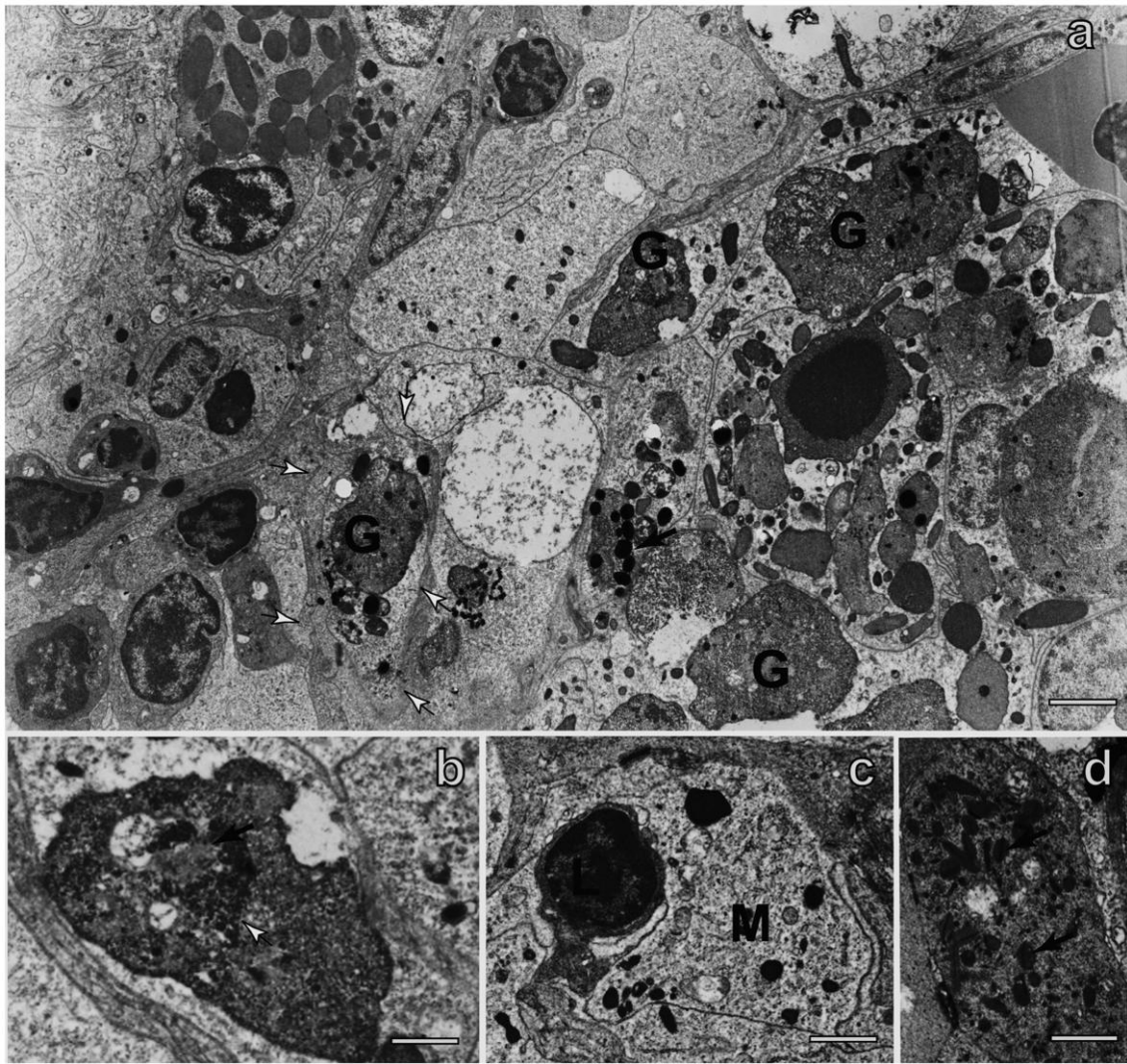


Figura 16. Eletromicrografias de CMMs do baço. Em **a** presença de grânulos elétrondensos (G) e pigmentos de melanina (seta preta). Observe um macrófago delimitado por membrana (setas brancas) apresentando grânulo citoplasmático característico (G) Note em **b**, detalhes de um grânulo exibindo características porções hidrofóbicas de lipofuscina e/ou ceróide (setas brancas) e baixa ocorrência de particulados elétrondensos típicos de ferritina (asterisco). Observar em **c**, estreita associação física entre um macrófago (M) e um linfócito (L). Um granulócito exibindo grânulos citoplasmáticos típicos contendo (setas) é observado em **d**. **a** barra= 1,5  $\mu$ m; **b**=0,1  $\mu$ m; **c**= 0,8 $\mu$ m e **d**= 0,9 $\mu$ m.



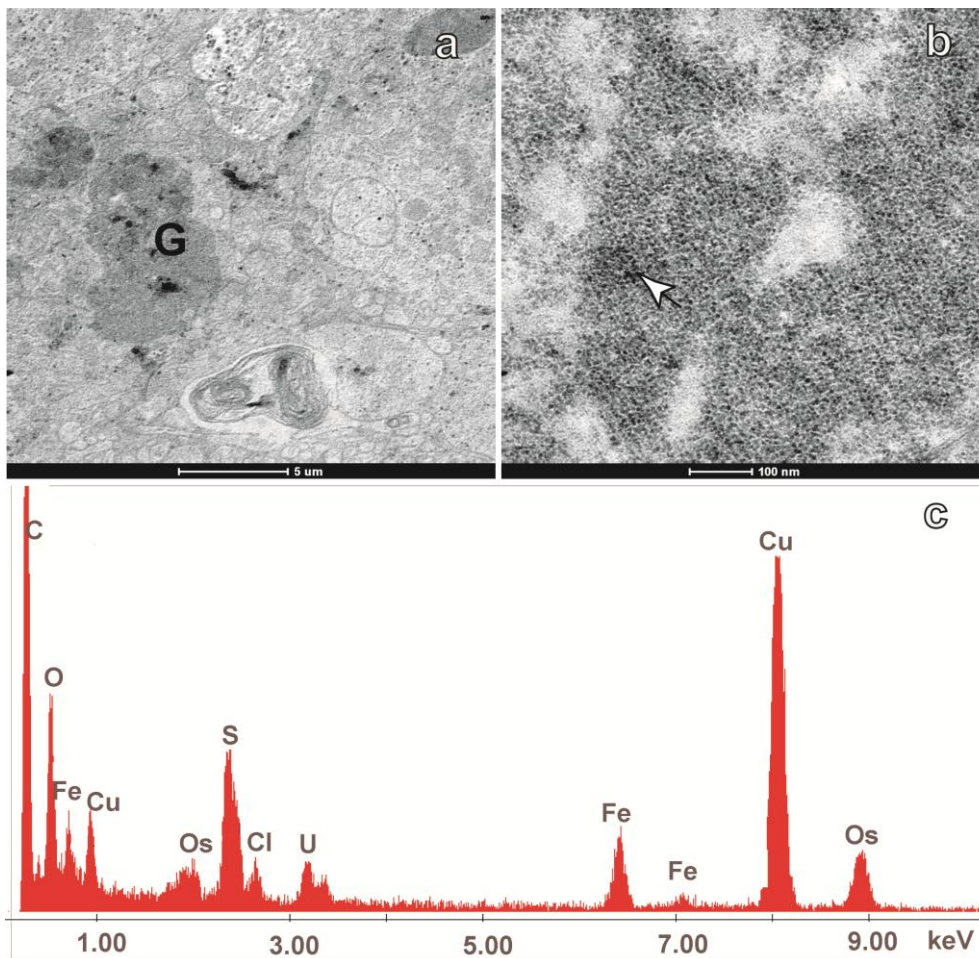


Figura 17. Em **a**, eletromicrografia de um CMM do fígado de *P. argenteus*. Note em **b**, magnificação de uma região no interior do grânulo evidenciado em **a** contendo particulado elétron-denso típico de ferritina. Um particulado foi selecionado (seta) por elétrons retro-espalhados. Em **c** espectro gerado pela microanálise de raios-x mostrando picos evidentes de Fe, O, S. A presença de C e Cl proveniente da resina Epóxi, e U e Os resultou da contrastação do material. Estes dados foram obtidos usando o microscópio eletrônico de transmissão Tecnai - G2-20 (FEI) com sistema acoplado EDS.

## 8. Microscopia analítica e microanálise de raios-x

Nos CMMs do fígado e do baço, a presença de grânulos elétron-densos foi confirmada pela criosecções analisadas por elétrons secundários e retro-espalhados. A presença de grânulos elétron-densos foi mais abundante nos CMMs do fígado. A microanálise de raios-X de um grânulo no interior do CMM hepático mostrou picos evidentes de C, O, P, S, Cl e Fe (Figuras 18a e 18c). Similarmente um grânulo no

interior de um CMM do baço analisado evidenciando picos de C, O, P, S e Cl, chamando a atenção a não identificação de Fe (Figuras 18b e 18d). Os animais analisados são provenientes do trecho JB.

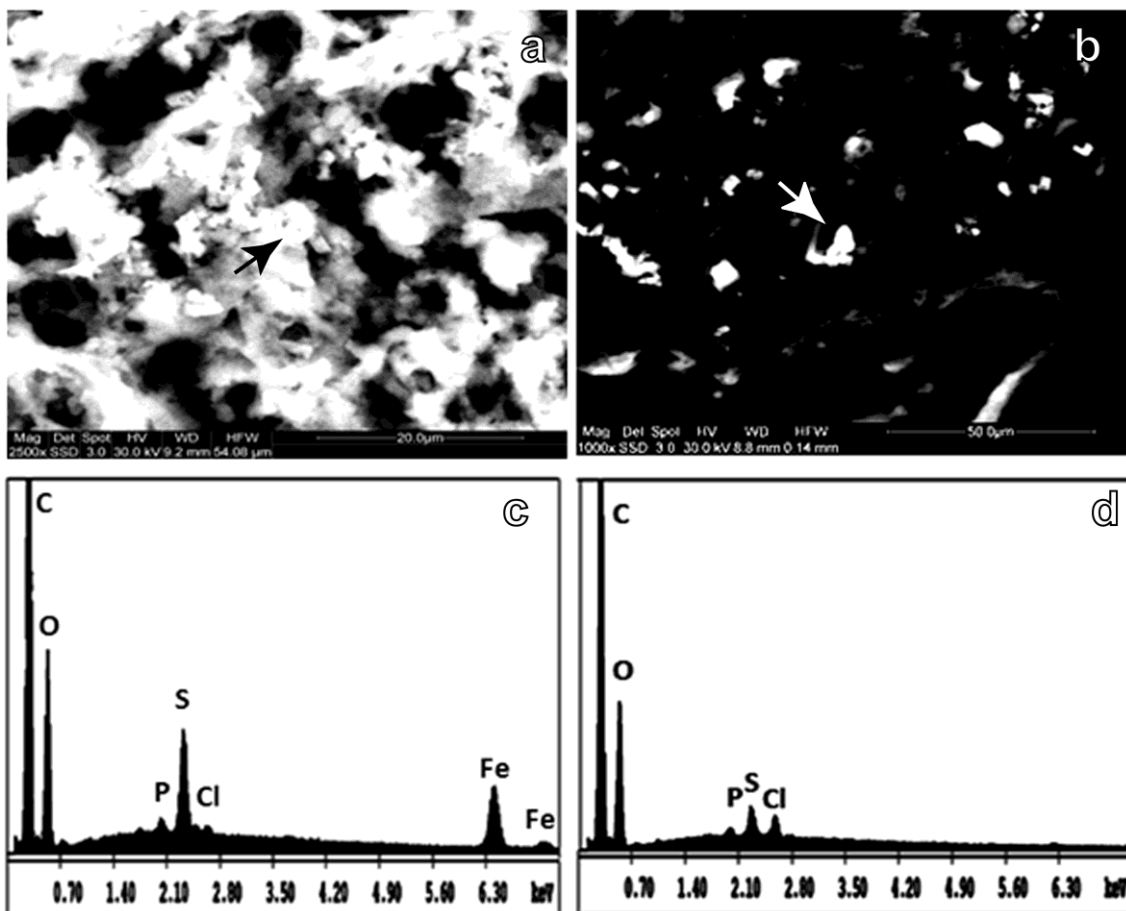


Figura 18. Eletromicrografias de CMMs do fígado e do baço de *P. argenteus*. Em **a**, imagem obtida por elétrons retroespalhados mostrando grânulos elétron-densos. Note o grânulo selecionado (seta preta) que foi analisado por microanálise de raios-x. Em **b** grânulo elétron-denso no interior de um CMM do baço (seta branca). Em **c** espectro obtido por microanálise de raios-X do grânulo mostrado em **a** com picos de C, O, P, S, Cl e Fe. Observe em **d** espectro do grânulo elétron-denso do baço mostrado em **b** evidenciando picos de C, O, P, S e Cl.

### 9. Quantificação da atividade de N-Acetylglucosaminidase (NAG)

Os macrófagos ativos nos CMMs do fígado e do baço de *P. argenteus* foram analisados através da medição da atividade NAG. As amostras de homogenizado de fígado apresentaram absorvância maior quando comparado com as amostras de

homogenizado do baço (Figura 19), sugerindo um maior número de macrófagos ativos nos CMMs do fígado quando comparados com os CMMs presentes no baço. Essa diferença na absorvância obtida para um dos órgãos destaca a disparidade metabólica entre os CMMs dos dois órgãos. Entre os diferentes pontos (JB e JA) os valores referentes a expressão da NAG não apresentaram diferença estatística.

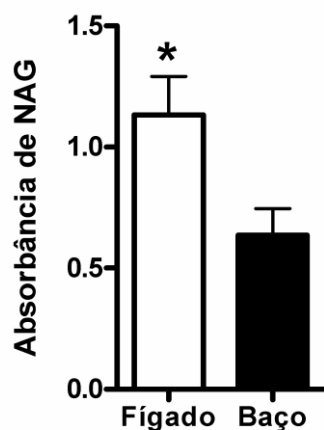


Figura 19. Taxa de absorvância da NAG em amostras de homogeneizado do fígado e baço de *Prochilodus argenteus*. (\*  $p < 0,05$ ).

## 10. Expressão de HIF-1

Os resultados de quantificação relativa dos genes-alvos através da PCR em tempo real foram obtidos através do  $\Delta CT$  dos genes S26 e HIF-1a. A quantificação relativa foi realizada a partir da análise comparativa do ácido nucléico dos genes-alvo com o do controle endógeno.

Para a obtenção dos resultados desse trabalho foi utilizado o método  $C_T$  comparativo, onde o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes alvos (média do  $C_T$  gene-alvo – média do  $C_T$  controle endógeno) gerando o  $\Delta C_T$ . Utilizando-se o  $\Delta C_T$  calculamos o  $\Delta\Delta C_T$  ( $\Delta C_T$  amostra –  $\Delta C_T$  do calibrador (amostra de referência)). Ao final utilizamos a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  para chegarmos à quantificação relativa de cada gene alvo.

Os resultados mostraram uma maior expressão para HIF-1a nos animais coletados em JB quando comparados com os animais provenientes de JA ( $p < 0,05$ ) (Figura 20).

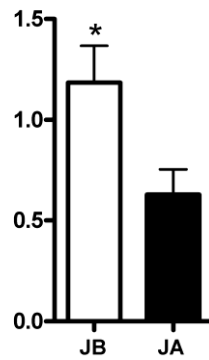


Figura 20. Expressão de HIF-1a no fígado de *Prochilodus argenteus*. (\*  $p < 0,05$ ).

## **DISCUSSÃO**

Conforme relatado por Bruslè e Anadón, (1996), Rocha, e Monteiro (2003), o fígado é um órgão de alta diversidade metabólica. Os índices somáticos teciduais tais como, índice hepatossomático (IHS) e e fator de condição (FC) têm sido considerados como importantes ferramentas para a avaliação das condições gerais de saúde e estado de metabolismo dos peixes teleósteos (ADAMS e MCLEAN 1985; TAVARES-DIAS et al, 2000). As diferentes condições nos parâmetros físico-químicos e nas concentrações de metais entre os dois pontos de estudo não afetaram o IHS de *P. argenteus*. Ao contrário, o FC respondeu a essas diferenças entre os trechos. Segundo Handelandet et al (2004), Kopekca e Pempkowiak (2008) e Luckenbachet et al (2007) a temperatura age influenciando diretamente o FC. De forma similar van Dyk et al (2007) demonstrou alterações no FC de animais expostos a metais pesados. No presente trabalho, esses mesmos fatores atuaram diretamente sobre o fator K, sugerindo a utilização desse índice como ferramenta auxiliar no monitoramento de fêmeas de *P. argenteus*.

Exposições estáticas de peixes a concentrações nominais altas de contaminantes são geralmente irreais quando se tentam relacionar os resultados de toxicidade para avaliação de campo do meio ambiente. Estudos com o objetivo de relacionar às alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares às condições ambientais devem levar em consideração a caracterização da citoarquitetura tecido normal, a qual deve ser previamente estabelecida. Também deve ser considerada a determinação da concentração de substâncias químicas tóxicas, tais como os metais pesados, associada aos parâmetros físico- químicos da água. (ROCHA e MONTEIRO, 1999; FISHELSON, 2006; AKIYOSHI e INOUE, 2004; FIGUEREDO-FERNANDES, FONTAÍNHAS-FERNANDES et al, 2006). Esses pontos foram abordados em nosso trabalho através dos resultados que destacam a influência, principalmente da temperatura, oxigênio dissolvido e concentração de metais sobre nosso modelo experimental.

A contaminação por metais pesados em JB pode ser um importante agente indutor nas alterações morfológicas e na ultra-estrutura nos fígados desses animais. Rabitto et al (2005) correlacionaram alterações similares do fígado de *Hoplias malabaricus* expostas ao Pb como agente agressor. Frente a esses estímulos, o fígado dos teleósteos pode responder tanto em termos bioquímicos, quanto histológicos (van der OOST et al., 2003). Contudo, as análises histológicas podem ser usadas como ferramentas versáteis para acessar informações sobre o estado geral de saúde dos peixes teleósteos (TRIEBSKORN et al, 2007).

Essas alterações nos animais coletados em JB podem ser refletidas nas análises histoquímicas do tecido hepático. Uma diminuição nos depósitos de carboidratos nos hepatócitos observado nesses animais pode refletir a depleção de glicogênio, quadro característico de animais expostos a condições de estresse (HINTON & LAURÉN, 1990). Baixos níveis de oxigênio dissolvido e temperatura da água são mencionados (Haman et al, 1997) como fatores para a diminuição nos níveis plasmáticos de glicose em truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, que alteram a função normal e afetam a integridade celular estrutural. Em *P. argenteus* essa reação poderia justificar a baixa marcação para PAS em hepatócitos e CMMs de animais coletados em JB, além do fato de que o desequilíbrio de carboidratos poderia prejudicar a síntese da vitelogenina (uma glicolipoproteína essencial para a manutenção dos ovócitos) necessária para o ciclo reprodutivo (KIME, 1999). Esse fato pode ser corroborado por Sato et al (2005), que mostraram um comprometimento na maturação dos ovócitos de fêmeas de *P. argenteus* coletadas no trecho JB.

O aspecto estrutural geral do fígado em *P. argenteus* mostra diferenças marcantes nas características histológicas e histoquímicas entre os diferentes locais de coleta, indicando assim que a abordagem histológica aqui utilizada para o fígado é altamente sensível às condições ambientais à jusante da barragem Três Marias. No fígado dos animais coletados em JB, alterações morfológicas, tais como vacuolização, núcleos deslocados, hiperemia, inflamações e necrose foram menos frequentes que em JA.

A ocorrência dos CMMs também pode ser um bom biomarcador de exposição a agentes de estresse diversos (RABITTO et al, 2005). Alguns autores demonstraram que CMMs em órgãos como fígado, rins, baço e intestino aumentam de tamanho e/ou frequência quando expostos a metais pesados e alcalóides (FOURNIER et al, 2001; AGIUS e ROBERTS, 2003; GLENCROSS et al, 2006; FISHELSON, 2006). Entretanto, não houve diferenças relativas a estes aspectos no presente estudo. Executando a diferença entre a composição dos pigmentos dentro de centros de diâmetros diferentes. Esse dado pode apontar para a dissimilaridade entre os CMMs de diferentes órgãos que é ressaltada no ANEXO I.

Nesse contexto, nosso estudo analisou a morfologia de CMMs do fígado e do baço e mostra que as variações no número, morfologia, distribuição dos pigmentos composição elementar e atividade NAG encontradas fornecem evidências dessa dissimilaridade metabólica dos CMMs nos diferentes órgãos. Estudos anteriores

(WOLKE, 1992; AGIUS e ROBERTS, 2003; FOURNIE et al, 2001; FISHELSON, 2006) têm sugerido que os CMMs podem aumentar em número e tamanho sob condição de estresse, mas a possível relação entre fígado e baço CMMs não é discutida.

Outro aspecto que aponta para essa diferença entre os órgãos são as características dos grânulos que contem os pigmentos. A ocorrência dos grânulos contendo pigmentos, tais como a melanina, a hemossiderina e a lipofuscina nos CMMs pode ser uma indicação de sua função metabólica (WOLKE, 1992; AGUIS e ROBERTS, 2003). A lipofuscina está associada ao desequilíbrio na renovação celular, envolvendo atividades lisossômicas e peroxidação lipídica de membrana (PICKFORD, 1953), enquanto hemossiderina está associada à degradação de hemácias e processos de armazenagem de ferro (AISEN et al, 2001). Em nosso estudo, nos CMMs do fígado a lipofuscina foi predominante nos CMMs menores do que  $0,010 \mu\text{m}^2$ , enquanto que os CMMs maiores que  $0,010 \text{mm}^2$  foram ricos em hemossiderina. Estes resultados mostram que no fígado de *P. argenteus*, os CMMs parecem não ter a mesma função, o que pode refletir uma diferença entre os CMMs do fígado e baço.

Nossos resultados demonstram também diferenças na distribuição dos pigmentos dos CMMs nos diferentes órgãos. Esses dados são corroborados pelo estudo histoquímico de Leknes (2004) que mostrou uma grande quantidade de grânulos contendo precipitados de ferro no fígado de *Xiphophorus maculatus*. A prevalência de hemossiderina, indicada pela presença de ferro detectado pela histoquímica de Perls, microanálise de raios-x e a associação entre eritrócitos e macrófagos em CMMs do fígado, demonstra que essas estruturas presente no fígado estão diretamente envolvidas no metabolismo do ferro, e, portanto estão associadas com atividade fagocítica. Isto contrasta com a baixa ocorrência deste pigmento em CMMs do baço, sugerindo uma diminuição na capacidade fagocitária destes macrófagos.

Rabitto et al (2005) associou a presença de hemossiderina no fígado de *Hoplias malabaricus* com eventos fagocitários. Além disso, Bucke et al (1992) mostraram que a diminuição em áreas ocupadas por hemossiderina em CMMs do baço de *Limanda limanda* foi associada com uma redução na atividade de fagocitose. Outro dado importante que demonstra claramente as diferenças na atividade fagocítica entre fígado e baço é a presença de grandes áreas desprovidas de pigmento nas amostras de baço, que não foram encontradas no fígado.

Os processos de fagocitose dos CMMs podem estar relacionados também à presença de lipofuscina (BRUSLÈ e ANADÓN, 1996), uma vez que a presença deste



pigmento está diretamente associada com a peroxidação lipídica (ou seja, o estresse oxidativo) de organelas membranosas (AGIUS e ROBERTS, 2003; DREVNICK et al, 2008; DING et al, 2010). Assim, a maior ocorrência de lipofuscina em CMMs do fígado do que a encontrada no baço indica a maior atividade fagocitária do primeiro em comparação com o último em *P. argenteus*.

Em contraste aos mamíferos, a melanogênese de peixes pode ocorrer em outras células estacionárias, tais como os macrófagos presentes em CMMs (HAUGARVOLL et al, 2006). Portanto, o aumento significativo de melanina em CMMs do baço pode indicar um papel na resposta imunológica. Na verdade, ROSAS et al (2002) mostraram que a melanina ativada pode mediar respostas imunológicas através da deposição de componentes C3 do sistema complemento, resultando em respostas inflamatórias.

As diferenças entre MMCs do fígado e baço foram ainda confirmadas, considerando os resultados com o MET e MEV neste estudo. Em CMMs de fígado, foi observada a presença de grandes áreas com depósitos de particulados de ferritina associada com porções de material hidrofóbico, que foram evidentes em picos de ferro e enxofre, caracterizadas por microanálise de raios-X. Utilizando métodos histoquímicos, Leknes (2004) descreveu a prevalência de ferro em grânulos nos CMMs hepáticos de *Xiphophorus maculatus*, contrastando com sua ausência nos CMMs do baço de *Trichogaster leeri* e *X. maculatus* (LEKNES, 2007).

Estes dados, juntamente com os nossos resultados de MET e microanálise de raios-X, reforçam nossa hipótese de que, além de armazenamento de ferro, os CMMs do fígado estão envolvidos em processos catabólicos celulares. Além disso, a identificação de enxofre e ferro nos grânulos dos CMMs encontrados no fígado indica a presença de complexos ferro-enxofre, que medeia processos de oxirredução (JOHNSON, 1998; AISEN et al, 2001). Este fato demonstra claramente o importante papel dos CMMs hepáticos no metabolismo do ferro. Estes dados são consistentes com os resultados da análise NAG mostrando uma maior taxa de absorbância no fígado quando comparado com o baço. Esses resultados sugerem a maior atividade fagocitária dos macrófagos presentes nos CMMs do fígado, uma vez que o ensaio de NAG é específico para macrófagos ativados (RUSSO et al, 2010). A estreita associação física entre macrófagos e linfócitos vista nos CMMs esplênicos de *P. argenteus* baço indica sua relação com reações imunológicas tais como eventos de apresentação de antígenos. Vigliano et al (2006) apresentaram evidências moleculares em sua análise imuno-histoquímica

mostrando marcação positiva para anticorpos de células dendríticas foliculares nos CMMs do baço de *Cyprinus carpio*, *Odontesthes bonariensis* e *Solea senegalensis*.

Concluimos que as diferenças na composição elementar dos CMMs que estão associados com as dissimilaridades em suas características morfológicas e de grânulo pigmento contendo pigmentos claramente apontam para diferenças metabólicas em CMMs do fígado e do baço de *P. argenteus*.

A partir desses resultados, propomos que estudos utilizando CMMs de *P. argenteus* como um biomarcador de estresse ambiental devam ser levados em consideração em situações distintas: estudo de estressores ambientais que levem ao estabelecimento de repostas imunológicas devem focar em CMMs do baço como agente de estudo; e por outro lado estressores que promovam alterações no estado metabólico normal das células em especial na renovação celular e processos de armazenamento devem ser desenvolvidos em CMMs presentes no fígado.

## **CONCLUSÕES**

A caracterização d melhor estado de saúde do peixe *Prochilodus argenteus* pode ser avaliada pela análise do fator de condição de Fulton (K).

Os *P. argenteus* coletados à jusante da barragem de Três Marias apresentam diferenças quanto aos aspectos histopatológicos e ultra-estruturais do fígado e do baço e em relação àqueles à jusante do Rio Abaeté

Os resultados indicam que as alterações teciduais e ultra-estruturais no fígado de *P. argenteus* são resultantes das variações ambientais relacionadas à temperatura, à oxigenação e à concentração de metais (Cd, Zn, Cu e As)

A degeneração hidrópica dos hepatócitos de *P. argenteus* pode ser utilizada como biomarcador à jusante da represa de Três Marias.

Os CMMs presentes no fígado e no baço de *P. argenteus* apresentam diferenças na morfologia, características ultra-estruturais dos grânulos.

Os CMMs hepáticos estudados estão principalmente envolvidos em processos relacionados à fagocitose e à armazenagem do ferro, diferindo dos CMMs do baço que têm seu papel voltado principalmente para respostas imunológicas.

O HIF-1a responde bem às variações de oxigenação em ambientes naturais.

O estudo das fêmeas em repouso gonadal pode ser utilizado como um importante agente de monitoração ambiental para as condições observadas no rio São Francisco à jusante da barragem de Três Marias.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ADANS, S.M.; MCLEAN, R.B., 1985. Estimation of largemouth bass, *micropterus salmoides* lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal of Fish Biology*, v. 26, 111-126.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26, 499-512.
- AGOSTINHO, A. A., 1992. Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios, p. 106-121. in: *Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil*. Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia. Maringá: Editora UEM, 127p.
- AGOSTINHO, A. A.; PELICICE, F. M.; GOMES, L. C., 2008. Dams and the fish fauna of the Neotropical region: impacts and management related to diversity and fisheries. *Brazilian Journal Biology* 68, 1119-1132.
- AKIYOSHI, H.; INOUE, A., 2004. Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zoological Science*, v. 21, 841-850.
- ALLGROVE, J., 2003. Disorders of calcium metabolism. *Current Paediatrics*, v. 13, 529-535.
- AISEN, P.; ENNS, C.; WESSLING-RESNICK, M., 2001. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism: a review. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 33, 940-959.
- ARANTES, F. P.; ALVES, H. J.; SCARPELLI, R. S.; MARIA, T. A. 2000. Estudo morfológico do baço de *Hemigrammus marginatus*, Ellis, 1911 (Pisces: Characidae). *Bios*, v.8, 89-95.
- AU, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, v. 48, 817-834.
- BALOGH, P.; HORVATH, G.; SZAKAL, A. K., 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, v. 52, 1287-1298.
- BAZZOLI, N., 2003. Parâmetros reprodutivos de peixe de interesse comercial da região de Pirapora. in: *Águas, peixes e pesca no São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, MG, 291p.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C; NETO, A. F., 1976. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 241p.

- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T., 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, v 22, 25 – 34.
- BLAZER, V. S., 2002. Histopathological assesment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 26, 85, 101.
- BAROUKI, R.; COUMOULA, X.; FERNANDEZ-SALGUERO, P. M., 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Letters*, v 58L1, 3608–3615.
- BROWN, B. E., 1982. The form and function of metal-containing “granules” in invertebrate tissues. *Biological Review*, v. 57, 621–667.
- BRUSLÉ, J. & ANADON, G. G. 1996. The Structure and Function of Fish Liver. In: *Fish Morphology*, Science Publishers, pp 77-93.
- CARDENAS, E. M.; HEITMAN, J., 1995. Role of calcium in t-lymfocyte activation. *Calcium Regulation of Cellular Functoin*, v. 30, 281-298.
- CESTA, M. F., 2006. Normal Structure, Function, and Histology of the Spleen. *Toxicologic Pathology*, v. 34,455–465.
- CORRÊA JUNIOR, J. D.; MALM, O.; SILVA, M.R.; LIMA, S.M.; ALLODI, S., 2005. Tissue distribution subcellular localization and endocrine disruption patterns induced by Cr and Mn in the crab *Ucides cordatus*. *Aquatic Toxicology*, v. 73, 139-154.
- DIJKSTRA, C. D.; VEERMAN, A. J. P., 1990. Normal Anatomy, Histology, Ultrastructure, Rat. In: *Monographs on Pathology of Laboratory Animals: Hemopoietic System* (T. C. Jones, J. M. Ward, U. Mohr and R. D. Hunt, eds.), pp. 185–93. Springer-Verlag, Berlin.
- DING, L.; KUHNE, W. W.; HINTON, D. E.; SONG, J.; DYNAN, W. S. 2010. Quantifiable biomarkers of normal aging in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *PLoS One* 5:1-11
- DOWD, R. D., 1995. Calcium regulation of apoptosis. *Calcium Regulation of Cellular Functoin*, v. 30, 255-280.
- DREVNICK, P. E.; ROBERTS, A. P.; OTTER, R. R.; HAMMERSCHMIDT, C.R.; KLAPER, R.; ORIS, J. T. 2008. Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. *Comparative Biochemistry and Physiology* 147:331-338.

- FIGUEIREDO-FERNANDES, A. M., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. A., MONTEIRO, F. A. F., REIS-HENRIQUES, M. A.; ROCHA, E., 2006. Temperature and gender influences on the hepatic stroma (and associated pancreatic acini) of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae): a stereological analysis by light microscopy. *Journal of Morphology*, v. 267, 221-230.
- FISHELSON, L., 2006. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney and liver in cardinal fish (Apogonidae Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology*, v. 267, 57-69.
- FOURNIE, J. W.; SUMMERS, J. K.; COURTNEY, L. A.; ENGLE, V. D.; BLAZER, V. S., 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, v. 13, 105-116.
- GARCIA-ABIADO, M. A.; MBAHINZIREKI, J.; RINCHARD, G.; LEE, K. J.; DABROWSKI, K., 2004. Effect of diets containing gossypol on blood parameters and spleen structure in tilapia, *Oreochromis* sp., reared in a recirculating system. *Journal of Fish Diseases*, v. 27, 359-368.
- GEORGE, S. G., 1982. Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*, 3-52.
- GIARI, L.; MANERA, M.; SIMONI, E.; DEZFULI, B. S., 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere*, v. 67, 1171-1181.
- GLANTZ, S. A., 1992. *Primer of Biostatistics*, 3ed, Library of Congress Cataloging-in-Publications, 440p.
- GLENCROSS, B.; EVANS, D.; RUTHERFORD, N.; HAWKINS, W.; MCCARFFERTY, P.; DODS, K.; JONES, B.; HARRIS, D.; MORTON, L.; SWEETINGHAM, M.; SIPSAS, S., 2006. The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilization and gastrointestinal histology. *Aquaculture*, v. 253, 512-522.
- GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P., 2003. Breve visão do São Francisco. in *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, MG, 291p.
- HAMAN, F.; ZWINGELSTEIN, G.; WEBER, J. M. 1997 Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273, 2046-2054.



- HANDELAND, S. O.; WILKINSON, E.; SVEINSBØ, B.; McCORMICK, S. D.; STEFANSSON, S. O. 2004. Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture* 233, 513-529.
- HAUGARVOLL, E.; THORSEN, J.; LAANE, M.; HUANG, Q.; KOPPANG, E. O. 2006. Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83+ teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Research* 19:214-225.
- HEALTH, A.G., 1995. Water Pollution and Fish Physiology, second ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL. pp. 125–140.
- HERRAEZ, M. P.; ZAPATA, A. G., 1986. Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 12, 117-126.
- HINTON, D. E.; LAURÉN D. J., 1990. Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure. in: MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. (eds.). *Biomarkers of Environmental Contamination*. Boca Raton, Lewis Publishers. pp. 51-65.
- HINTON, D.E., BAUMANN, P.C., GARDNER, G.C., HAWKINS, W.E., HENDRICKS, J.D., MURCHELANO, R.A., OKIHIRO, M.S., 1992. Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, Chelsea, MI, USA, pp. 155-210.
- HINTON, D.E., 1994. Cells, cellular responses, and their markers in chronic toxicity of fishes. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), *Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Lewis Publishers CRC press, pp. 207-240.
- IVAN, M., KONDO, K.; YANG, H.; KIM, W.; VALIANDO, J.; OHH, M.; SALIC, A.; ASARA J. M., LANE, W. S.; Kaelin Jr, W. G., 2001. HIF targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science* v 292, 464–468.
- JOHNSON, M. K. 1998. Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Current Opinion in Chemical Biology* 2:173-181.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J., 2006. *Histologia básica*, 10 ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 488p.

- KAJIMURA, S.; AIDA, K., DUAN, C., 2006. Understanding Hypoxia-Induced Gene Expression in Early Development: In Vitro and In Vivo Analysis of Hypoxia-Inducible Factor 1-Regulated Zebra Fish Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1 Gene Expression. *Molecular and Cellular Biology*. v 26, 1142–1155.
- KIME, D. E. 1999 Environmentally induced endocrine abnormalities in fish. *Environmental Science & Technology* 12, 27-48.
- KOPECKA, J.; PEMPKOWIAK, J., 2008. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 70, 379–391.
- LEKNES, I. L., 2004. Melano–macrophage centers in the liver of platyfish, *Xiphophorus maculatus*, poeciliidae: teleostei. *Zoology*, v. 107, 201-204.
- LEKNES, I. L., 2007 Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gourami and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta Histochem* 109:164-168
- LINDESJOJO, E; HUSOY, A.M; PETTERSON, I; FORLIN, L., 1996. Histopathological and immunohistochemical studies in roundnose grenadier (*Covyphaenoides rupestris*) in the Skagerrak, north sea. *Marine Environmental Research*, v. 42, 229-233.
- LUCKENBACH, J. A., MURASHIGE, R.; DANIELS, H. V.; GODWIN, J.; BORSKI, R. J., 2007. Temperature affects insulin-like growth factor and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 146, 95-104.
- LUNA, L. G., 1968 In: Luna LG (ed). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*, California. pp 38-39.
- MALARKEY, D. E.; JOHNSON, K.; RYAN, L.; BOORMAN, G.; MARONPOT, R. R., 2005. New insights into functional aspects of liver morphology. *Toxicologic Pathology*, v. 33, 27–34.
- MANSOUR, S. A.; SIDKY, M. M., 2002. Ecotoxicological Studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chemistry*, v 78, p. 15–22.
- MATOS, P.; FOTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; CARROLA, J.; ROCHA, E., 2007. Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 89, 73–80.
- MARCHAND, M. J.; VAN DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; BARNHOORN, I. E. J.; BORNMAN, M. S., 2008. Histopathological alterations in the Liver of the Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in South Africa. *Environmental Toxicology* 24,133-147.

- McCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. 1990. Production in: Biomarkers of environmental contamination / edited by John F. McCarthy, Lee R. Shugart Lewis Publishers, Chelsea, MI
- MEBIUS, R. E.; KRAAL, G., 2005. Structure and function of the spleen. *Nature Reviews Immunology* v. 5, 606-616.
- MELA, M.; RANDI, M. A. F.; VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., 2007. Effects of the dietary methylmercury on the liver and kidney histology in the neo tropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 68, 426-435.
- MONTENEGRO, M, R; FRANCO, M. 1995. Patologia Processos Gerais. 3 ed, Editora Atheneu, São Paulo-SP, 262p.
- NAGATA, T., 2004. X-ray microanalysis of biological specimens by high voltage electron microscopy. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, v. 39, 185-319.
- NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V.; MAKRAKIS, M. C.; PAVANELLI, C. S., 2001. Ovos e larvas de peixes de água doce. *Desenvolvimento e manual e identificação*. Editora EDUEM, Maringá, PR, 203-205.
- NETO, F. F.; ZANATA, S.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; BUSSOLARO, D.; FERRARO, M.V.M.; RANDI, M.A.F.; COSTA, J.R.M.A.; CESTARI, M.M.; ROCHE, H.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A., 2007. Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicology in Vitro*, v. 21, 706-715.
- NIKINMAA, M.; REES, B. B. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 288: 1079–1090.
- NIKOLSKY, G.V., 1963. The ecology of fishes. *London Academic Press*, 352p.
- NRC: Committee on Biological Markers of the National Research Council, 1987. Biological markers in environmental health research. *Environ. Health Perspect.* 74, 3-9.
- PAGANO, R. R, 1990. Understanding Statistic, in the behavioral sciences, 3 ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication, 542p.
- PALADE, G., 1975. *Science*, v. 189, 347-358.

- PHILLIPS, D.J.H.; RAINBOW, P.S., 1989. Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research*, v. 28, 207-210.
- PEAKALL, D.B., 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assessment. *Toxicological. Ecotoxicological. News*. v.1, 55–60.
- PICKFORD, G.W., 1953. Fish endocrinology a study of the hypophysectomized male killfish, *fundulus heterocitus* (l). *Bulletin of the Bigham Oceanographic Collection*. Yale University, 5-41.
- PRESS, C.; EVENSEN Ø. 1999. The morphology of the immune system in teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 9: 309–318.
- RABITTO, I.S.; ALVES-COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 60, 147-156.
- RAPPAPORT, A. M.; BOROWY, Z. J.; LOUGHEED, W. M.; AND LOTTO, W. N., 1954. Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. *Anatomical Record*, v. 119, 11–34.
- ROBERTS, R. J., 1975. Melanin-containing cells of teleost fish and their relation to disease. *The Pathology of Fishes*, 399-428.
- ROBBINS, S.L., 1994. Pathologic basis of disease. 5<sup>th</sup>, Editora Philadelphia, 1400p.
- ROCHA, E; MONTEIRO, R.A.F., 1999. Histology and citology of fish liver: a review. in: *Ichthyology: Recent Research Avances*. Editora, *Oxford Ibh Publishing*, 321-344.
- ROCHA, E; ROCHA, M.J; MONTEIRO, R.A.F., 2003. Seasonal changes in fish hepatocytes and correlations with the endocrine system. in: *Fish Adaptations*. Editora, Sience Publisher, 384-403.
- ROSAS, Á. L.; MACGILL, R. S.; NOSANCHUK, J. D.; KOZEL, T. R.; CASADEVALL, C. 2002. Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9:144-148.
- RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. R, 2006. *Patologia; Bases clinicopatológicas da medicina*. 4ed. Editora, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 1625p.
- RUSSO, R. C.; ALESSANDRI A. L.; GARCIA, C. C.; CORDEIRO, B. F.; PINHO, V.; CASSALI, G. D.; PROUDFOOT, A. E. I.; TEIXEIRA, M. M., 2010. Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*doi:10.1165/rcmb.2009-0406OC

- SAITO, H.; YOKOI, Y.; WATANABE, S.; TAJIMA, J.; KURODA, H.; NAMIHISA, T., 1988. Reticular meshwork of the spleen in rats studied by electron microscopy. *American Journal of Anatomy*, v. 181, 235–252.
- SAMPAIO, E. V.; LÓPEZ, C. M., 2003. Limnologias física, química e biológica da represa de Três Marias e do São Francisco. in *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Editora PUC Minas, Belo Horizonte, MG, 291p.
- SATO, Y.; GODINHO, H. P., (2003) Production. In: Migratory fishes of the São Francisco River. (ed. by Harvey J., Ross B. & Baer A), pp. 195–232 Publisher World Bank, Victoria.
- SATO, Y.; BAZOLLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M.B.; DE MIRANDA, M.O.T., 2005. Influence of the river Abaeté in the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argeteus* in the São Francisco river, downstream from the Três Marias dam, southeastern Brazil. *River Research and Applications*, v. 8, 939-950.
- SEGNER, H; 1998. Isolation and primary culture of teleost hepatocytes m. review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 120, 71–81.
- SEMENZA, G. L. (1999). Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. v15, p551–578.
- SHIEH, W. Y.; JEAN, W. D.; LIN, Y. T.; & TSENG, M. 2003. *Marinobacter lutaoensis* sp. nov., a thermotolerant marine bacterium isolated from a coastal hot spring in Lutao, Taiwan. *Canadian Journal of Microbiology* 49, 244–252.
- SIMKISS, K.; WILBUR, K. M., 1989. Biomineralization, cell biology and mineral deposition. *Academic*, San Diego, 337pp.
- SIROKÁ, Z.; DRASTICHOVÁ, J., 2004. Biochemical Markers of Aquatic Environment Contamination – Cytochrome P450 in Fish. A Review. *Acta Veterinaria*, v73, p. 123-132.
- SOITAMO, A.J.; RABERGH, C. M. I.; GASSMANNI, M.; SISTONEN. L.; NIKINMAA, 2001. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1a) from Rainbow Trout. *The Journal of Biological Chemistry*, v 276, p. 19699–19705.
- SOHAL, R.S.; PETERS, P.D.; HALL, TA., 1977. in: Amorphous minerals in biology. *Bulletin De L'Institut Océanographique*, Monaco, v. 14, 49-54.
- SURESH, N., 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of Environmental Biology*, v. 30, 505-508.

- TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M.L.; MORAES, F.R., 2000. Relação hepatossômática e esplenossômática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 17, 273-281.
- TAYAL, A.K.; KAUR I.; MATHUR, R.P., 2000. Bioaccumulation and localization of exogenous cadmium in a teleost by electron microscopy (TEM) and its specific quantization by electron probe x-ray microanalysis (EPMA). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 8, 475-482.
- TAYLOR, G. M.; SIMKISS, K. 1989. Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. in: *Biom mineralization – Chemical and Biochemical Perspectives*, 427-459.
- TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON. D. E., 1997. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. *Aquatic Toxicology*, v. 37, 51-70.
- TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R.; FACHEL, J. M. G. 2009. Monitoring of a swamp river contaminated by multiple waste. *Acta Limnology*, 21, 79-88.
- TRIEBSKORN, R.; CASPER, H.; SCHEIL, V.; SCHWAIGER, J. 2007. Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:1405-1416.
- van der OOST, R., BEBER, J.; VERMEULEN, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.13, 57-149.
- van DYK, J.C.; PIETERSE, G. M.; van VUREN, J. H. J., 2006. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, 432-440.
- VELKOVA-JORDANOSKA, L.; KOSTOSKI, G., 2005. Histopathological Analysis Of Liver In Fish (*Barbus Meridionalis Petenyi* Heckel) in reservoir Trebenita. *National Croatian*, v. 14, 147-153.
- VIGLIANO, F. A.; BERMUDEZ, R.; QUIROGA, M. I.; NIETO, J. M. 2006. Evidence for melano-macrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunology* 21:467-471.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1993. Biomarkers and risk assessment: concepts and principles. Environmental Health Criteria 155, World Health Organization, Geneva.
- WOLKE, R.E., 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish*, 91-108.

**ANEXOS**

**Trabalho I: Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus***



**Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus***

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Journal:                      | Cell and Tissue Research  |
| Manuscript ID:                | CTR-11-0182.R1  |
| Manuscript Type:              | Regular Article   |
| Date Submitted by the Author: | 29-Oct-2011   |
| Complete List of Authors:     | Ribeiro, Heder; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Procópio, Marcela; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Gomes, Juliana; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Vieira, Francisco; Centro Universitario Metodista Izabela Hendrix, Nucleo de Biociências e Formação de Professores Russo, Remo; Universidade Federal de Minas Gerais, Fisiologia e Biofísica Balzuweit, Karla; Universidade Federal de Minas Gerais, Física Chiarini-Garcia, Hélio; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Rizzo, Elizete; Universidade Federal de Minas Gerais, Morfologia Corrêa Junior, José; UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, MORFOLOGIA |
| Keywords:                     | melanomacrophage centres, histochemistry, analytical electron microscopy, liver, spleen   |

----- Original Message -----

Subject: CTR-11-0182.R1

Date: Mon, 14 Nov 2011 06:36:58 -0500 (EST)

From: [ctr@springer.com](mailto:ctr@springer.com)

To: [correajr@icb.ufmg.br](mailto:correajr@icb.ufmg.br), [correajr@anato.ufrj.br](mailto:correajr@anato.ufrj.br)

Manuscript No. CTR-11-0182.R1

Title : Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus*

By: Ribeiro, Heder; Procópio, Marcela; Gomes, Juliana; Vieira, Francisco; Russo, Remo; Balzuweit, Karla; Chiarini-Garcia, Hélio; Rizzo, Elizete; Corrêa Junior, José

Dear Prof. Corrêa Junior,

We are pleased to inform you that your manuscript CTR-11-0182.R1, entitled "Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus*", has been accepted for publication in CTR.

The manuscript will now be forwarded to the publisher, from whom you will shortly receive information regarding the correction of proofs and fast online publication.

Best wishes and thanks,

Prof. Klaus Unsicker  
Coordinating Editor CTR

Prof. Werner Franke  
Section Editor CTR

Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus*

Ribeiro, H. J.<sup>1</sup>; Procópio, M. S.<sup>1</sup>; Gomes, J. M. M.<sup>1</sup>; Vieira, F. O.<sup>2</sup>; Russo, R. C.<sup>3</sup>; Balzuweit, K.<sup>4</sup>; Chiarini-Garcia, H.<sup>1</sup>; Rizzo, E.<sup>1</sup>; Corrêa Jr, J. D.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, BH, Brasil

<sup>2</sup>Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix, Nucleo de Biociências e Formação de Professores, 30160-012 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>3</sup>Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, BH, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Física, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, 31270-901 Belo Horizonte, BH, Brasil

Correspondence to:

José Dias Corrêa Junior

Departamento de Morfologia

Instituto de Ciências Biológicas

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, Pampulha, 31270-901

Minas Gerais, MG, Brazil.

Tel: 55 31 3499-2792; Fax: 55 31 3499-2771

E-mail: [correajr@ufmg.br](mailto:correajr@ufmg.br)

**Abstract**

Melanomacrophage centres (MMCs) are formed by macrophage aggregates containing pigments such as hemosiderin, melanin, and lipofuscin. MMCs are found in animals such as reptiles, amphibians, and mainly fishes, in organs such as the kidney, spleen, thymus, and liver. In teleost fish, several functions have been attributed to MMCs, including the capture and storage of cations, phagocytosis of cellular debris, and

immunological reactions. Considering that some authors have suggested the use of MMCs as a tool for assessment of environmental impact, we aimed to describe the different metabolic processes performed by MMCs in different organs (liver and spleen) using the *Prochilodus argenteus* teleost as animal model. MMCs from the liver and spleen were assessed by histochemistry, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, X-ray microanalysis techniques, and biochemical assay for *N*-acetylglucosaminidase activity. The data showed metabolic differences in MMCs between the liver and spleen of *P. argenteus* in their morphometric characteristics and biochemical and elemental composition. The implications of these findings are discussed, focusing on their role in organ metabolism.

**Key words:**

melanomacrophage centres, histochemistry, analytical electron microscopy, liver, spleen

## Introduction

Melanomacrophage centres (MMCs) are nodular clusters of macrophages that usually contain pigments such as melanin, hemosiderin, and lipofuscin (Roberts, 1975; Fournie et al, 2001; Agius and Roberts, 2003). MMCs are found in different phyletic groups, such as reptiles (Rund et al, 1998), amphibians (Loumbourdis and Vogiatzis, 2002), and fishes (Wolke, 1992; Fournie, 2001; Fishelson, 2006), in organs such as the kidney, spleen, thymus, and liver (Bruslè and Anadon, 1996; Blazer, 2002; Agius and Roberts, 2003; Fishelson, 2006). Diverse functions have been attributed to teleost MMCs, including the capture and storage of cations and phagocytosis of cellular debris (Wolke, 1992; Leknes, 2001; Agius and Roberts, 2003). Agius (1985) characterized MMCs as an integral part of the fish reticuloendothelial system. These functional characteristics of MMCs led many authors to suggest the use of MMC number and size as biomarkers in environmental impact assessment (see Herraiez and Zapata, 1986; Wolke, 1992; Fishelson, 1996; Fournie et al, 2001). Despite the importance of MMCs as a biological marker, their roles in different organs are poorly described in the literature (Stentiford et al, 2003; Rabitto et al, 2005). This study aims to analyze possible metabolic differences in MMCs between the liver and spleen of the teleost fish *Prochilodus argenteus* and their potential use as biomarkers in environmental studies.

The characteristics of granules within the MMCs, which contain pigments such as melanin, hemosiderin, and lipofuscin, can provide specific information about the metabolic status of MMCs, as well as their differences among organs (Happaranta et al, 1996; Rabitto et al, 2005). Considering that different biological responses have been associated with each intracellular granule type, the findings of previous studies focusing on MMC granules may lead to a better understanding of MMC functionality (Wolke,

1992; Blazer, 2002; Agius and Roberts, 2003; Rabitto et al, 2005; Fishelson, 2006). Valuable insights could also be obtained from studies that highlight the presence of intracellular granules reflecting different metabolic cellular activities such as protein synthesis, calcium storage, iron turnover, and detoxification processes (George, 1982; Taylor and Simkiss, 1989; Corrêa Junior et al, 2003; Corrêa Jr et al, 2009). Moreover, some types of intracellular phosphorous-containing granules could be used as biomarkers owing to their incorporation of various chemical elements, including trace metals (Taylor and Simkiss, 1989).

Our study is the first in the literature to characterize the MMCs of the liver and spleen using the teleost fish *P. argenteus* as animal model. Commonly known as curimatá-pacu, this species is endemic to the São Francisco river basin; it has commercial importance as it represents 50% of the fishery production in the Três Marias region in the Minas Gerais state of southeastern Brazil; it is available all year round (Sato and Godinho, 2003; Sato et al, 2005). We analyzed the MMCs in the liver and spleen of *P. argenteus* by light microscopy, histochemistry, electron microscopy, and biochemical approaches in order to determine their metabolic role and examine possible metabolic differences among different organs. We also assessed the potential of this species as a teleost model for future studies of environmental impact under natural or experimental conditions.

## **Materials and methods**

### Processing of animals and their liver and spleen

*P. argenteus* females averaging  $37.8 \pm 0.8$  cm in length were caught with a hand net in the São Francisco River near the Três Marias dam in August 2008. Immediately after capture, 20 animals were killed by cervical scission according to a protocol (065/05) approved by CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal of the Universidade Federal de Minas Gerais). The liver and spleen were removed and sectioned on the spot. Pieces of the same organ regions were fixed in Bouin's fluid, Carnoy's liquid, and modified Karnovsky's solution (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in sodium cacodylate buffer 0.2 M, pH 7.3). Some of the samples were quickly frozen in dry ice. The samples were then brought to the laboratory for analysis.

#### Light microscopy and morphometrical analysis

Bouin's-fixed tissue fragments were processed for routine paraffin embedding, sectioned to 6- $\mu$ m thickness, deparaffinized with xylene, hydrated in solutions of ethanol, and stained by Perls' histochemical technique (adapted from Luna, 1968). This enabled the identification of granules containing melanin, hemosiderin, and lipofuscin pigments. With this technique, melanin remains black; hemosiderin stains in blue, and lipofuscin stains yellow-brown (Blazer, 2002). These results were confirmed after analysis of serial sections of liver and spleen MMCs labeled with Masson/Fontana stain (for melanin), aldehyde fuchsin (for lipofuscin; adapted from Luna, 1968), (supplementary materials 1 and 2). Three slides per animal containing liver and spleen sections were stained by Perls' technique. One whole section per animal was digitized using a Samsung digital camera S860 attached to the ocular lens of an Olympus BX41 microscope. For each slide, 10 fields were sequentially photographed under a 40 $\times$  objective. A total area of 0.75mm<sup>2</sup> was analysed for each animal and organ. All MMCs

observed in the liver and spleen were counted and measured using Image Pro-Plus software®. Results were obtained for the average number of MMCs per relative area, surface area of MMC distributions expressed in square millimeters (mm<sup>2</sup>), the numbers of areas with pigment-containing granules, and the number of non-granulated areas. The latter data were obtained through measurement of 10 MMCs per animal by using segmented images in red, blue, and green (corresponding to melanin, hemosiderin, and lipofuscin areas, respectively) and yellow for the areas without pigment-containing granules. The results were expressed as the percentage of occupied area for each type of pigment-containing granule relative to the MMC total area. Digital image calibration was performed using an Olympus stage micrometer ruler with 0.01-mm markings. All procedures for image analysis were previously standardized.

#### Transmission electron microscopy

The modified Karnovsky's-fixed samples of liver and spleen were rinsed 3 times in sodium cacodylate buffer (0.1 M) and post-fixed in 1% osmium tetroxide in 2% potassium ferrocyanide for 2 h in the dark. The samples were dehydrated in increasing concentrations of acetone, and embedded in PolyBed 812 resin (Polysciences Inc.). Ultrathin 80-nm sections were obtained with an LKB ultramicrotome, mounted on copper grids, and stained with uranyl acetate for 10 min and with lead citrate for 5 min. The sections were examined with a Zeiss-EM10 transmission electron microscope at 80 keV.

#### Scanning electron microscopy and analytical microscopy (X-ray microanalysis)



For scanning electron microscopy (SEM), some of the samples were fixed in Carnoy's liquid containing 1% Na<sub>2</sub>S and cryopreserved in sucrose solutions at 10% and 20% for 2 h and at 30% overnight. The materials were embedded in a medium liquid adhesive for freezing (Tissue-Tek® O.C.T. Compound; Electron Microscopy Sciences) and frozen at -80°C. The blocks were then sectioned to 10-µm thickness with a Leica CM185 cryostat. The sections were mounted on plastic coverslips (Thermanox®), refrozen in liquid nitrogen, and freeze-dried for 6 h under a vacuum of  $100 \times 10^{-3}$  mbar at -56°C using a lyophilizer (Labconco). Then, the sections were metalized with carbon in an evaporator (Hitachi Model HUS4G) and analyzed by SEM with secondary electrons, backscattered electron imaging, and X-ray microanalysis on a Quanta 200 FEG microscope (FEI).

Quantification of macrophage accumulation into the tissues by *N*-acetylglucosaminidase activity measurement

The extent of macrophage accumulation in the tissues was measured, adapted from Russo et al, 2010, by assaying *N*-acetylglucosaminidase (NAG). Activity in homogenized liver and spleen samples were performed using one hundred milligrams of liver and spleen was homogenized in 2 mL of saline solution (0.9%) containing 0.1% (v/v) Triton X-100, and centrifuged at 4°C for 10 min at  $1500 \times g$ . The supernatants were used for the NAG assay. The reaction was started at 37°C for 10 min in 96-well microplates by the addition of 100 µL of *p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminide (Sigma) in citrate/phosphate buffer (0.1 M citric acid, 0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 4.5), in a final concentration of 2.24 mM, to 100 µL of supernatant from the processed tissue sample diluted in citrate/phosphate buffer. The reaction was stopped by the addition of

100  $\mu$ L of 0.2 M glycine buffer (pH 10.6), and the absorbance was read at 405 nm in a spectrophotometer (EMax, Molecular Devices). The results were expressed as absorbance relative to 100 mg of wet tissue. The NAG assays performed under these conditions were specific for macrophages.

#### Statistical analysis

The nonparametric Mann–Whitney test was used to analyze the relative areas of MMCs and the percentages of the pigment-containing granules within the MMCs, as well as the NAG expression in the liver and spleen of animals caught at the 2 sites. The data were tested using 95% confidence intervals ( $p < 0.05$ ).

## Results

### MMC histochemistry and morphometrical analysis

The morphology of the *P. argenteus* MMCs from the liver and spleen exhibited substantial differences, showing different randomly distributed pigments. Hemosiderin intracellular granules were more frequently observed in liver MMCs than in spleen MMCs. In addition, the MMCs in the liver were regular in shape, whereas those in the spleen appeared to be polymorphic (Fig. 1).

Regarding the There was a significantly greater number of MMCs present in the liver than in the spleen (Fig. 2). The MMC areas observed in the liver and spleen ranged 1000–34,000  $\mu\text{m}^2$  and 1000–32,000  $\mu\text{m}^2$ , respectively (Fig. 3). A striking difference between liver and spleen MMCs was the distribution of pigment-containing granules. The MMCs of the liver were characterized by a high abundance of hemosiderin. These MMCs also contained a considerable amount of lipofuscin but a small amount of melanin. The spleen MMCs, on the other hand, exhibited a prevalence of non-granulated areas, and the presence of lipofuscin and large amounts of hemosiderin and melanin (Fig. 4).

### Transmission electron microscopy

Similar to the results obtained by light microscopy, transmission electron microscopy (TEM) revealed marked differences between the MMCs in the liver and spleen of *P. argenteus*. The major cell type observed in liver MMCs was macrophages with

pleomorphic nuclei and cytoplasm rich in heterogeneous, electron-dense granules. These granules displayed large areas of small, electron-dense particles composed of ferritin aggregates (supplementary material 3); also present were areas containing hydrophobic materials similar to membrane degradation products and stacked membranes. A close physical association between an erythrocyte and a macrophage was also observed in a liver MMC, indicating a phagocytic process (Fig. 5). These intracellular ultrastructural characteristics were different among the organs. The macrophage was the principal cell type found in spleen MMCs; however, some leukocytes, such as lymphocytes and granulocytes, were also frequently noted. Unlike the liver MMCs, the macrophages in spleen MMCs displayed sparse intracytoplasmic, electron-dense granules. Another striking difference was the close physical association between macrophages and lymphocytes in spleen MMCs, suggesting antigenic activities. The splenic MMC fine structure, showing isolated melanin-like pigments and granules containing lipofuscin-resembling hydrophobic materials associated with few ferritin deposits, suggests differences in MMC metabolism between the liver and spleen (Fig. 6).

#### Elementary composition of MMC granules

In both liver and spleen MMCs, the presence of electron-dense granules was confirmed by cryosections analyzed by secondary and backscattered electron imaging. Electron-dense particles were more abundant in liver MMCs. Spectral analysis of the liver MMC granules showed evident peaks of C, O, P, S, Cl, and Fe. Except for the Fe characteristic peak, the spleen MMC granules also showed peaks of C, O, P, S, and Cl (Fig. 7).

### *N*-Acetylglucosaminidase activity measurement

The active macrophages in the MMCs of the liver and spleen of *P. argenteus* were quantified through measurement of NAG activity. The liver homogenate samples exhibited increased absorbance when compared with the spleen homogenate samples (Fig. 8), indicating a greater number of active macrophages in liver MMCs than in spleen MMCs. The lowest value ( $p < 0.05$ ) of absorbance obtained for spleen highlights the metabolic disparity between the MMCs of the 2 organs.

## Discussion

This study analyzed MMC morphology and content in *P. argenteus*, and the results corroborate our previous hypothesis that there are metabolic differences in MMCs among different organs. The variations in number, morphology, distribution of pigment-containing granules, elementary composition, and NAG activity described in this paper provide evidence on the dissimilarity between the metabolic functions of MMCs in the liver and spleen. Previous studies (Wolke, 1992; Agius and Roberts, 2003; Fournie et al, 2001; Fishelson, 2006) have suggested that MMC can increase in number and size under stress condition, but the possible relationship between liver and spleen MMCs was little discussed.

Taking into account the granule pigment characteristics described in this study, our results demonstrate differences in the distribution of pigment-containing granules in MMCs between the liver and spleen. These data are corroborated by the histochemical study of Leknes (2004) that showed a large amount of precipitates in iron-containing granules in the liver of *Xiphophorus maculatus*. The prevalence of hemosiderin, indicated by the presence of iron detected by histochemistry, X-ray analysis, and the association between erythrocytes and macrophages in MMCs of the liver provide clear evidence that the MMCs present in the liver are directly involved in iron metabolism, and thus associated with phagocytic activity. This contrasts with the low occurrence of this pigment in spleen MMCs, suggesting a decrease in the phagocytic capacity of these macrophages.

Rabitto et al (2005) associated the presence of hemosiderin in the liver of *Hoplais malabaricus* with phagocytic events. Further, Bucke et al (1992) showed that the

decrease in areas occupied by hemosiderin in spleen MMCs of *Limanda limanda* was associated with a reduction in phagocytic activity. Another important finding that clearly demonstrates differences between liver and spleen phagocytic activity is the presence of large areas devoid of pigment-containing granules in the spleen samples, which were not found in the liver samples.

The phagocyte activity of the MMCs can be related to lipofuscin (Bruslè and Anadon, 1996), since this pigment is directly associated with lipid peroxidation (i.e., oxidative stress) of membranous organelles (Agius and Roberts, 2003; Drevnick et al, 2008; Ding et al, 2010). Thus, the greater occurrence of lipofuscin in liver MMCs than in spleen MMCs indicates the higher phagocytic activity of the former compared with the latter in *P. argenteus*.

In contrast to mammals, fish melanogenesis can occur in other stationary cells such as macrophages present in MMCs (Haugarvoll et al, 2006). Therefore, the significant increase of melanin in the pigment-containing granules in spleen MMCs may indicate a role in immunological response. In fact, Rosas et al (2002) found that activated melanin mediated immunological responses through deposition of C3 components of the complement system, resulting in inflammatory responses.

The differences between MMCs of the liver and spleen are further confirmed by considering the previous findings with the TEM and SEM analyses data in this study. In liver MMCs, the presence of large areas of particulate structures typical of ferritin deposits was associated with portions of hydrophobic material, which were evident in peaks of iron and sulfur, as characterized by X-ray microanalysis. Using histochemical methods, Leknes (2004) described the prevalence of iron-containing granules in the liver MMCs of *X. maculatus*, contrasting with their absence in the spleen MMCs of *Trichogaster leeri* and *X. maculatus* (Leknes, 2007).

These data, together with the results of our TEM and X-ray microanalysis, reinforce our hypothesis that, in addition to iron storage, liver MMCs are involved in catabolic cellular processes. Moreover, the identification of sulfur and iron in liver MMC granules indicates the presence of the iron–sulfur complex, which mediates redox processes (Johnson, 1998; Aisen et al, 2001). This fact clearly demonstrates the important role of liver MMCs in iron metabolism. These data are consistent with the results of the NAG analysis showing a higher absorbance rate in the liver than in the spleen. It suggests phagocytic activity of macrophages in liver MMCs, since the NAG assay is specific for active macrophages (Russo et al, 2010). The close physical association between macrophages and lymphocytes seen in the MMCs of *P. argenteus* spleen indicates that the role of these MMCs in immune reactions could be mainly related to antigen presentation. Vigliano et al (2006) presented molecular evidence in their immunohistochemical analysis showing positive antibody labeling of follicular dendrite cells in the spleen MMCs of *Cyprinus carpio*, *Odontesthes bonariensis* and *Solea senegalensis*.

We conclude that the differences in the elementary composition of MMCs that are associated with the dissimilarities in their morphological characteristics and pigment-containing granules clearly point to metabolic differences in MMCs of the liver and spleen in *P. argenteus*.

From the results of the present study, we propose that studies using *P. argenteus* MMCs as a biomarker of environmental stress should utilize spleen MMCs for immunological response analysis, whereas liver MMCs can be utilized to study metabolic status, especially in cell turnover and storage processes.

## **Acknowledgements**



This study received financial support from CNPq and FAPEMIG (Brazilian Agencies for Science and Technology). The authors are grateful to the Estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias and the CODEVASF/CEMIG convention for assistance in fish sampling.

## References

Agius C (1985) The melano-macrophage centres in fish: a review. In: Manning MJ, Tatner MF (eds). Fish Immunology. Academic Press: London; pp 85-105

Agius C, Roberts RJ (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. J Fish Dis 26:499-509

Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. J Biochem Cell Biol 33:940-959

Blazer VS (2002) Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. Fish Physiol Biochem 26:85-101

Bruslè J, Anadon GG (1996) The structure and function of fish liver. In: Munshi JSD, Dutta HM (eds). Fish Morphology. Science Publishers: New York; pp 77-93

Bucke D, Vethaak AD, Lang T (1992) Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMCs) in dab *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. Mar Ecol Prog Ser 91:193-196

Corrêa Junior JD, Allodi S, Farina M (2003). Enzymatic, analytical and structural aspects of electron-dense granules in cells of *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda) hepatopancreas. *Cell Tissue Res* 311:107-116

Corrêa Jr JD, Bruno MI, Allodi I, Farina M (2009) Effects of H<sup>+</sup> concentration on amorphous mineral granules: structural stability and elemental mobilization. *J Struct Biol* 166:59-66

Ding L, Kuhne WW, Hinton DE, Song J, Dynan WS (2010) Quantifiable biomarkers of normal aging in the Japanese medaka fish (*Oryzias latipes*). *PLoS One* 5:1-11

Drevnick PE, Roberts AP, Otter RR, Hammerschmidt CR, Klaper R, Oris JT (2008) Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. *Comp Biochem Physiol* 147:331-338

Fishelson L (2006) Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *J Morphol* 267:57-69

Fournie JW, Summers JK, Courtney LA, Engle VD (2001) Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *J Aquat Anim Health* 13:105-116

George SG (1982) Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In: Vernberg WB, Calabrese A, Thurberg FP, Vernberg FJ (eds). *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*. Academic Press: New York; pp 3-52

Haaparanta A, Valtonen ET, Hoffaman R, Colmes J (1996) Do macrophages centres in freshwater fishes reflect the differences in water quality? *Aquatic Toxicology* 34: 253-272

Haugarvoll E, Thorsen J, Laane M, Huang Q, Koppang EO (2006) Melanogenesis and evidence for melanosome transport to the plasma membrane in a CD83<sup>+</sup> teleost leukocyte cell line. *Pigment Cell Res* 19:214-225

Herraez MP, Zapata AG (1986) Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Vet Immunol Immunopathol* 12:117-126

Johnson M K (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr Opin Chem Biol* 2:173-181

Leknes IL (2001) The uptake of foreign ferritin by macrophages in the spleen, trunk kidney and liver of platy. *J Fish Biol* 59:1412-1415

Leknes IL (2004) Melano-macrophage centers in the liver of platyfish, *Xiphophorus maculatus*, poeciliidae: telesotei. *Zoology* 107:201-204

Leknes IL (2007) Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta Histochem* 109:164-168

Loumbourdis NS, Vogiatzis AK (2002) Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicol Environ Saf* 53:52-58

Luna LG (1968) In: Luna LG (ed). *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, California*. pp 38-39

Rabitto IS, Alves-Costa JRM, Silva de Assis HC, Pelletier É, Akaishi FM, Anjos A, Randi MAF, Oliveira-Ribeiro CA (2005) Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histological and biochemical findings. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:147-156

Rosas ÁL, MacGill RS, Nosanchuk JD, Kozel TR, Casadevall C (2002) Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins. *Clin Diagn Lab Immunol* 9:144-148

Roberts RJ (1975) Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In: Ribelin WE, Migaki G (eds). *The Pathology of Fishes*. University of Wisconsin: Madison, WI; pp 55-91

Rund CR, Christiansen JL, Johnson JC (1998) In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: comments on melanomacrophage morphology. *Pigment Cell Res* 11:114-119

Russo RC, Alessandri AL, Garcia CC, Cordeiro BF, Pinho V, Cassali GD, Proudfoot AEI, Teixeira MM (2010) Therapeutic effects of evasin-1, a chemokine binding protein, in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; doi:10.1165/rcmb.2009-0406OC

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

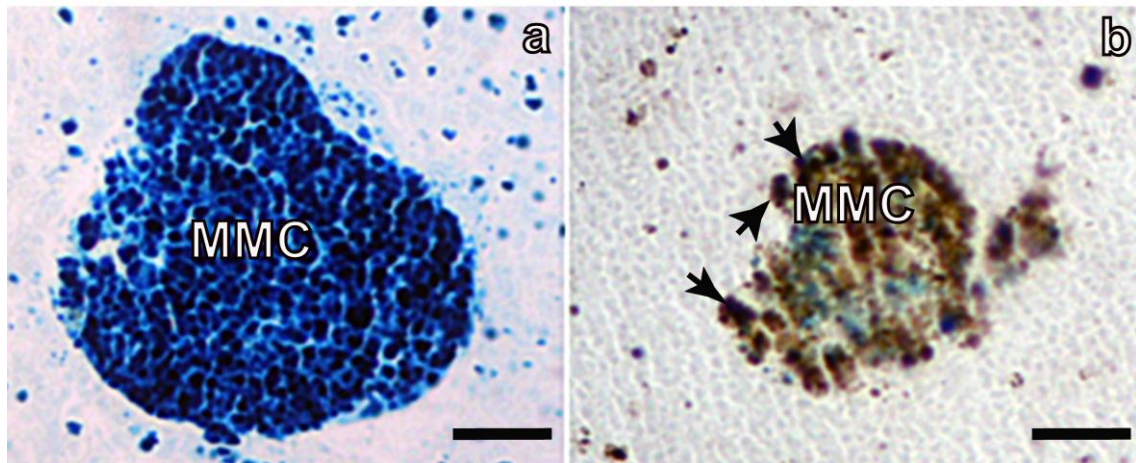
Sato Y, Bazzoli N, Rizzo E, Boschi MB, Miranda MOT (2005) Influence of the Abaeté River in the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. *River Res Applic* 21:939-950

Stentiford GD, Longshaw M, Lyons BP, Jones G, Green M, Feist SW (2003) Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Mar Environ Res* 55:137-159

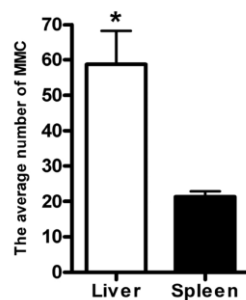
Taylor MG, Simkiss K (1989) Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. In: Mann S, Webb RJ, Williams RJP (eds) *Biom mineralization: chemical and biochemical perspectives*. VCH Verlagsgesellschaft: Weinheim; pp 427-460

Vigliano FA, Bermudez R, Quiroga MI, Nieto JM (2006) Evidence for melanomacrophage centres of teleost as evolutionary precursors of germinal centres of higher vertebrates: an immunohistochemical study. *Fish Shellfish Immunol* 21:467-471

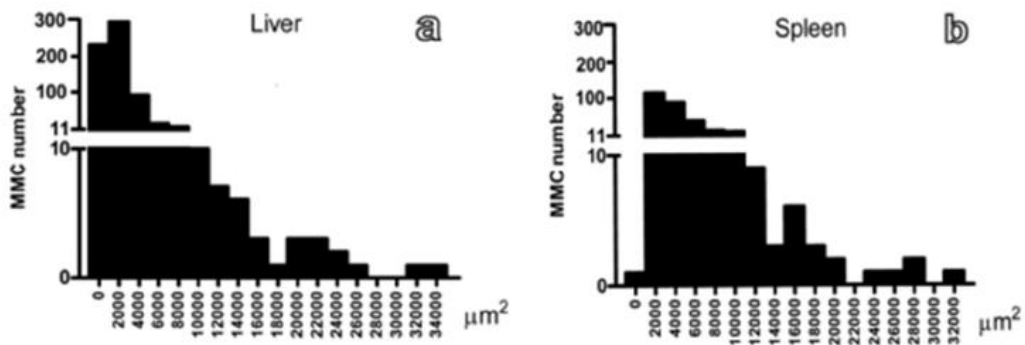
Wolke RE (1992) Piscine macrophage aggregates: a review. *Annu Rev Fish Dis* 2:91-108



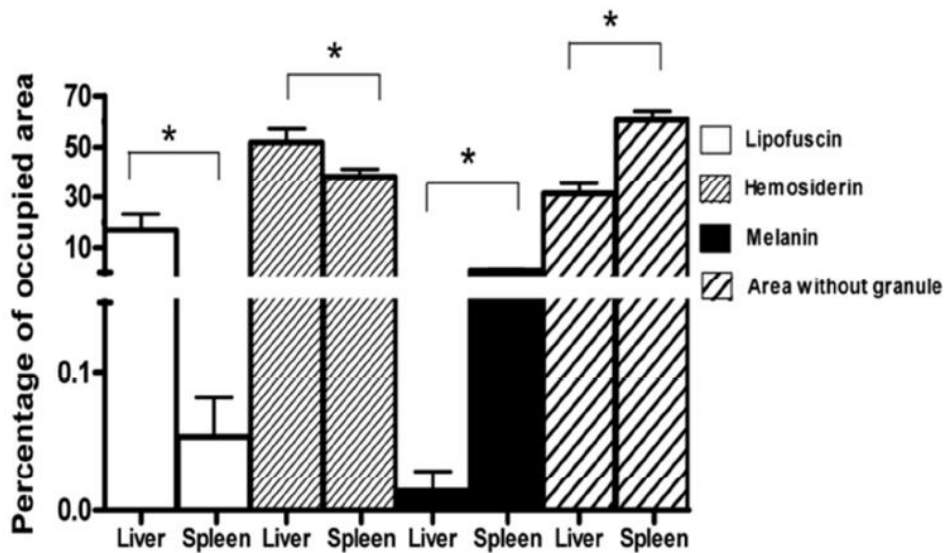
**Figure 1** Light micrographs of the liver and spleen of *Prochilodus argenteus*, stained by Perls' histochemical technique. (a) A liver section exhibiting MMC pigment-containing granules predominantly labeled with hemosiderin (blue). (b) A spleen MMC exhibiting lipofuscin and/or ceroid (yellow brownish) and melanin (arrows) pigments, and areas devoid of labeling. Scale bar: 25  $\mu$ m



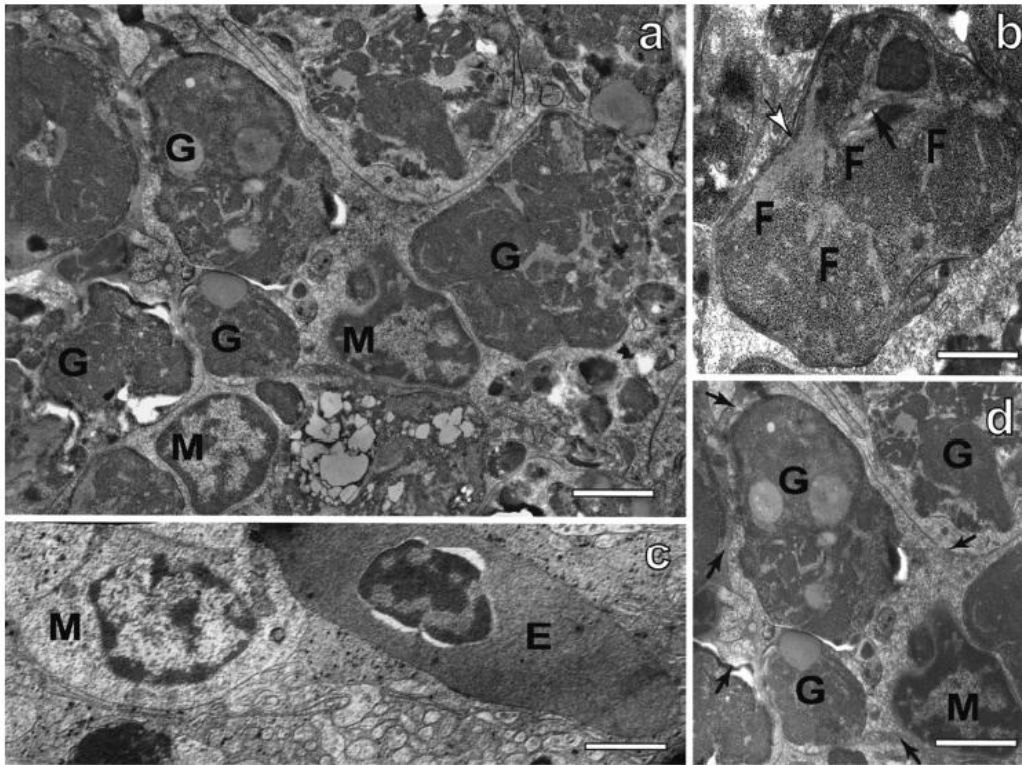
**Figure 2** Number of MMCs in the similar area in liver and spleen of *Prochilodus argenteus* (\* $p < 0.05$ )



**Figure 3** Frequency distribution of MMC area in the liver (a) and spleen (b) of *Prochilodus argenteus*

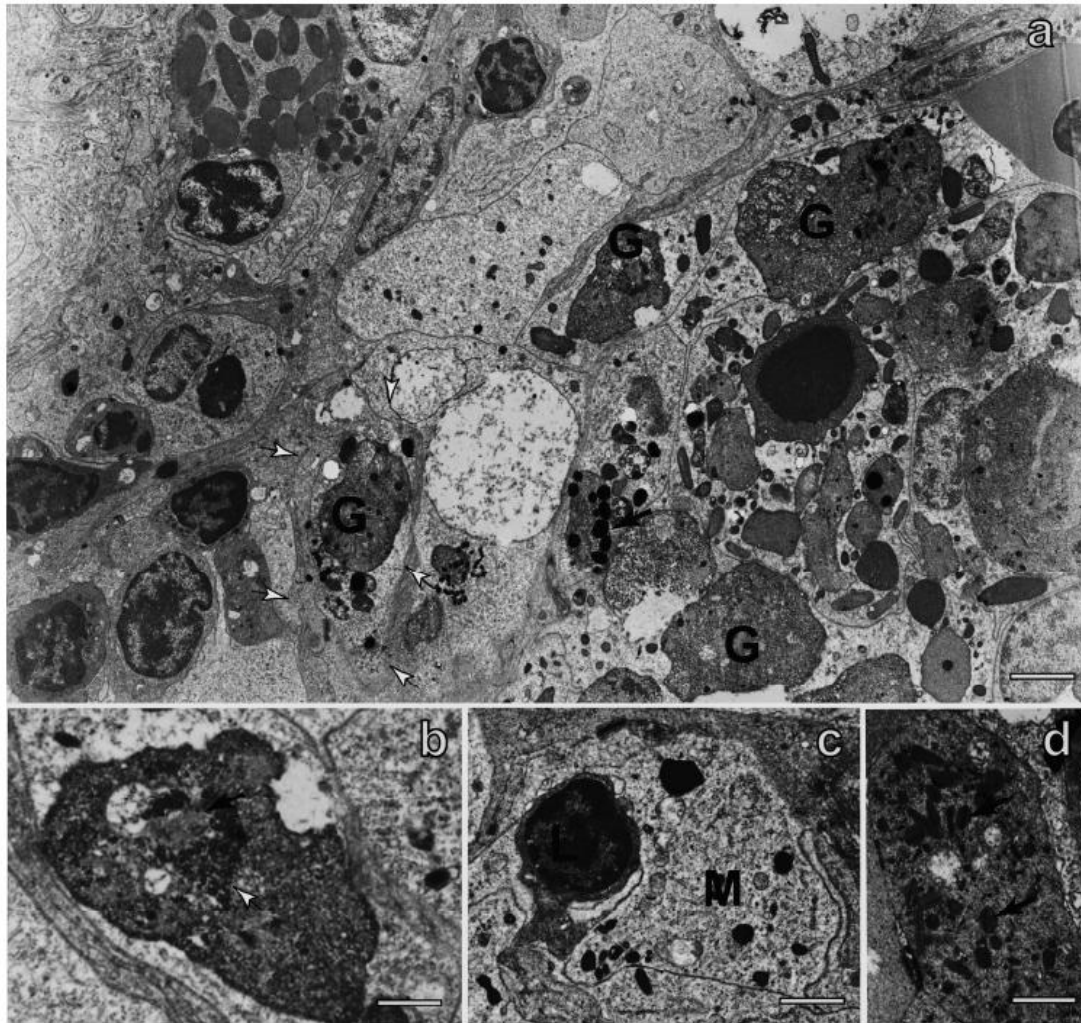


**Figure 4** Histogram showing the percentages of areas occupied by pigment-containing granules (lipofuscin, hemosiderin, and melanin) and non-granulated areas in *Prochilodus argenteus* liver and spleen (\* $p < 0.05$ )

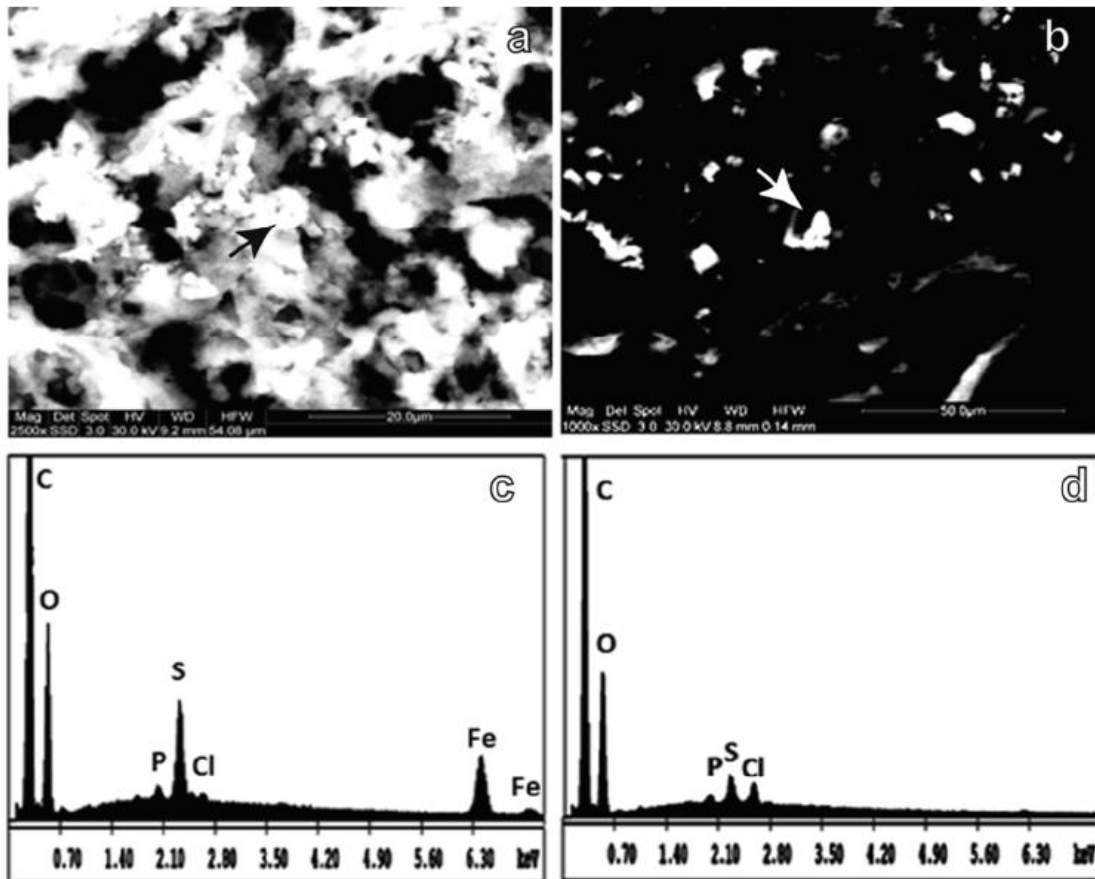


**Figure 5** Electron micrographs of liver MMCs. (a) Macrophage nuclei (M) and several intracytoplasmic electron-dense granules (G) can be observed. Scale bar: 1  $\mu\text{m}$ . (b) A magnified granule exhibiting a large area of small, electron-dense particles of ferritin aggregates (F); membrane stacks (black arrow) and lipid degradation products (white arrow) are visible. Scale bar: 0.10  $\mu\text{m}$ . (c) A close physical association between an erythrocyte and a macrophage can be seen. Scale bar: 0.9  $\mu\text{m}$ . (d) Details of a macrophage delimited by a membrane (arrows) and exhibiting characteristic granules in the cytoplasm. Scale bar: 0.25  $\mu\text{m}$

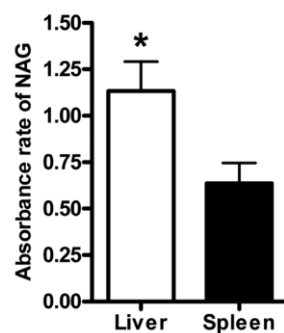




**Figure 6** Electron micrographs of spleen MMCs. **(a)** Presence of electron-dense granules (G) and melanin (black arrow). Note the macrophage delimited by a membrane (arrows) and showing characteristic granules in the cytoplasm. Scale bar: 0.15  $\mu\text{m}$ . **(b)** Details of a granule exhibiting characteristic hydrophobic portions of lipofuscin and/or ceroid (white arrows) and low occurrence of electron-dense particulate materials resembling ferritin (asterisk). Scale bar: 0.1  $\mu\text{m}$ . **(c)** A close physical association between a macrophage (M) and a lymphocyte (L) can be observed. Scale bar: 0.8  $\mu\text{m}$ . **(d)** A typical granulocyte displaying intracytoplasmic granules containing electron-dense spine-like structures (arrows). Scale bar: 0.9  $\mu\text{m}$



**Figure 7** Electron micrographs of liver and spleen MMCs. (a) Backscattered electron images of electron-dense granules in a liver MMC (black arrow). (b) Electron-dense granules of a spleen MMC (white arrow). (c) Spectrum obtained by X-ray microanalysis of the granule in (a) showing peaks of C, O, P, S, Cl, and Fe. (d) Spectrum of the electron-dense granule in (b) showing peaks of C, O, P, S, and Cl



**Figure 8** Absorbance rate of NAG in homogenate samples from the liver and spleen of *Prochilodus argenteus* (\* $p < 0.05$ )

**Trabalho II: Functional Dissimilarity of Melanomacrophage Centres in Liver and Spleen from the Females of the Teleost Fish *Prochilodus argenteus***

## Dashboard

- To submit a new manuscript, click on the "Submit a Manuscript" link below.
- Clicking on the various manuscript status links under "My Manuscripts" will display a list of all the manuscripts in that status at the bottom of the screen.
- To continue a submission already in progress, click the "Continue Submission" link in the "Unsubmitted Manuscripts" list.

If you have a query regarding your submission, please contact Georgina Haslam at the Editorial Office (E-mail: [ghaslam@wiley.com](mailto:ghaslam@wiley.com), Phone: +44 (0) 1865 476705).

### My Manuscripts

- 1 [Unsubmitted Manuscripts](#)
- 0 [Revised Manuscripts in Draft](#)
- 0 [Submitted Manuscripts](#)
- 0 [Manuscripts with Decisions](#)
- 0 [Manuscripts I Have Co-Authored](#)
- 0 [Withdrawn Manuscripts](#)
- 0 [Invited Manuscripts](#)

### Author Resources

 [Click here to submit a new manuscript](#)

This section lists the subjects of the five most recent e-mails that have been sent to you regarding your submission(s). To view an e-mail, click on the link. To delete an e-mail from this list, click the delete link.

### Unsubmitted Manuscripts

| Manuscript Title  | Date Created | Continue Submission   | Delete  |
|---|--------------|---|---|
| Environment influences on <i>Prochilodus argenteus</i> liver collected from São Francisco river, Brazil [ <a href="#">View Submission</a> ] | 08-Nov-2011  |  |  |

[top](#)

ScholarOne Manuscripts™ v4.7.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2011. All Rights Reserved.  
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

**Environment influences on *Prochilodus argenteus* liver collected from São Francisco river, Brazil**

**Ribeiro, Heder José<sup>1,3</sup>, Moro, Luciana<sup>2</sup>, Procópio, Marcela dos Santos<sup>3</sup>, Arantes, Fábio. Pereira<sup>3</sup>, Santos, Hélio, Batista<sup>5</sup>, Castro, Antônio Carlos<sup>3</sup>, Pereira, Luciano Almeida<sup>6</sup>, Sato, Yoshimi<sup>4</sup>, Corrêa-Junior, José Dias<sup>3\*</sup>.**

*1 Departamento de Patologia – Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena 190, Belo Horizonte – Minas Gerais - 30130-100 – Brazil.*

*2 Departamento de Patologia Geral - Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte – Minas Gerais - 31270-901 – Brazil.*

*3 Departamento Morfologia –Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte – Minas Gerais - 31270-901 – Brazil.*

*4 Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e Parnaíba – CODEVASF – Estação de Piscicultura e Hidrobiologia de Três Marias, P. O. Box 11, Três Marias - Minas Gerais - 39.205-000 – Brazil.*

*5 Universidade Federal de São João del Rei (UFSJ), Campus Centro Oeste, Brazil.*

*6 Colégio Técnico - Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte – Minas Gerais - 31270-901 – Brazil.*

*\*Email: [correajr@icb.ufmg.br](mailto:correajr@icb.ufmg.br)*

*Prof. José Dias Corrêa-Junior  
Av. Antônio Carlos, 6627  
Pampulha, Belo Horizonte, MG, Brazil  
31270 901*

## ***Abstract***

For the evaluation of the *Prochilodus argenteus* liver, specimens were caught in two sites of São Francisco river. Biometric data of body and liver were obtained to calculate the hepatosomatic index and the condition factor for surveying the general health conditions of the animals. Hepatic fragments were fixed and embedded in paraffin and submitted to hematoxylin & eosin, periodic acid-Schiff (PAS) and Perls histochemical techniques. For transmission electron microscopy (TEM) evaluation specimens were fixed in Karnovsky solution. Morphological analyzes were performed aiming to characterize the hepatocytes and melanomacrophage centers (MMC). At the same time samples of water and mud were analyzed by atomic absorption spectrophotometry technique aiming to detect the heavy metals presence. Our results showed variations in the hepatic cytoarchitecture among animals from the different sites. The size, number and granule composition of the MMCs were evaluated in the animals from the different sites. Morphological alterations as well as the metabolic aspects concerning the MMC and pigments containing granules are discussed.

*Key words: melanomacrophage, Prochilodus argenteus, heavy metals, atomic absorption spectrophotometry*

## ***1. INTRODUCTION***

The liver in teleost fishes is an important organ like mammalian, directly involved in protein synthesis, iron storage, synthesis and secretion of the bile and detoxification process. It also plays a fundamental role in carbohydrate and lipid mobilization, vitellogenin synthesis and metabolism of exogenous substances (Tavares-Dias, Martins & Moraes 2000; Matos, Fotaínhas-Fernandes, Peixoto, Carrola & Rocha 2007; Neto, Zanata, Silva de Assis, Bussolaro, Ferraro, Randi, Costa, Cestari, Roche & Oliveira Ribeiro 2007; van Dyk, Pieterse & van Vuren 2007). Due to the liver involvement in multiples physiological processes its morphology can be responsiveness to several stress factors presenting peculiar histopathology depending of the external aggressor. For this reason, morphological evaluation of the teleostei liver has been utilized as an auxiliary tool to study contamination in different water courses (Bruslè & Anadon 1996).

Among the liver assessments, the literature considers the hepatosomatic index (HSI) related to the condition factor (CF) as excellent predictors of adverse health in fish (Adams & McLean 1985; Evans Hills & Dickson 2000; Diniz, Peres & Pihan; Abdel-Tawwab, Mousa, Ahamad & Sakr 2007). HSI and CF values could be considered as resulting from different metabolic pathways associated with degenerative processes. This index can be associated to histopathological studies becoming a powerful tool of assessment of situation more realistic of the health of fish.

Histopathological evaluates on liver can be an additional method of assessment possible adaptive and/or degenerative processes due to their relative technical viability, low cost and the ability to display semi-lethal disturbance in specimens from different origins (Bernet, Schmidt, Meier, Burkhardt-Holm & Wahli 1999; Rocha & Monteiro 1999; Lukin & Sharova 2004; Wolf & Wolfe, 2005). Liver histoarchitectural damage has been cited as displayed as mononuclear cellular infiltration and congestion

occurrence as described in carp caught from contaminated reservoir by industrial effluents and organochlorine pesticides (Ayas Ekmekey, Ozmen & Yerli 2007)

In the *Hoplias malabaricus* specie, leukocytes infiltrations were associated to necrosis and Disse's space damages after exposure to methylmercury in the diet as described by Mela, Randi, Ventura, Carvalho, Pelletier & Oliveira Ribeiro (2007). Caballero, Izquierdo, Kjorsvik, Fernández & Rosenlund (2004) showed an increase of hepatocytes cytoplasmatic vacuolization with displaced nucleus in *Sparus aurata* after feeding long-term oil-rich diet. In addition, hepatocytes vacuolization, cellular swelling, hyaline and lipid droplets in *Oreochomis mossambicus* species exposed to cadmium and zinc were also described (van Dyk et al. 2007). These effects are less frequent or absent in controls groups or animals collected in a no stressed environment. In these studies, morphological alterations concerning the general cytoarchitecture of the parenchyma focused mainly in the hepatocytes and melanomacrophage centres (MMC) features.

The MMC are described as macrophage aggregates containing pigmented granules of hemosiderin, lipofuscin and melanin (Roberts 1975; Wolke 1992; Agius & Roberts 2003). In teleostei these structures occur mainly in organs such as liver, kidney and spleen (Wolke 1992; Bruslè & Anadon 1996; Agius & Roberts 2003; Leknes 2004). It was suggested that an increase in the number and in the area of MMC is sensitive to stress factors such as those described in the three species of the *Lepisosteus* family exposed to organochlorines and metals (Hartley, Thiyagarajah & Treinies 1996). Similarly, MMC variations were observed in *Hoplias malabaricus* exposed to Pb (II), Tributyltin (TBT) (Rabitto, Alves Costa, Silva de Assis, Akaishi, Anjos, Randi & Oliveira Ribeiro 2005) and parasitic or bacterial infections (Haaparanta, Valtonen, Hoffmann & Holmes 1996; Agius & Roberts, 2003). This responsiveness to external biotic and abiotic agents allows the use of the MMC in environmental monitoring programs (Fournie, Summers, Courtney & Engle 2001). However few studies describing their occurrence, size, distributions, and pigment-containing patterns in liver under different experimental or environmental conditions, associated to the histological aspects in teleostei fishes, are available in the literature.

The present study aims to analyze the liver of the teleost curimatã-pacu, *Prochilodus argenteus*, a migratory fish from the São Francisco River basin. This species have commercial value reaching 15 Kg of body weight and comprising 50 % fishery product in Três Marias region, Minas Gerais state, Brazil (Sato & Godinho 2003).

In Três Marias city region the São Francisco river is dammed up for Três Marias Dam. In many cases dam construction, have provided valuable benefits such as irrigation capabilities, hydroelectric power, navigation (Graf 1999), however it is known that downstream of the dams

important alterations in physico-chemical parameters such as temperature, pH, oxygenation of the water are observed. These parameters can be to influence directly the growth, reproduction and health of aquatic organisms, especially fish (Sato et al, 2005; Marchand, van Dyk, Pieterse, Barnhoorn & Bornman 2009).

In Três Marias city region, besides of the presence Três Maris dam, other fact that deserves attention is the presence in right margin of São Francisco river the plant Companhia Mineira de Metais. Located about 1 Km of the dam, the plant develop mining activities directed to production mainly derived from zinc and sulfuric acid (Sampaio & López 2003). These characteristic are not observed in other segment of São Francisco river about 34 km of the dam, utilized in our study as referential site.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### Animals sampling

Forty mature females of *P. argenteus* ( $34.40 \text{ cm} \pm 0.83$ ,  $627.26 \text{ g} \pm 52.74$ ) were captured from two different sites of the São Francisco River, at the Três Marias dam, Minas Gerais, Brazil in August of 2005 and October of 2008 during the dry season. The females are selected for the study aiming to discard possible influences related to gender. The first site of animal capture was located immediately downstream the dam (Site 1) and the other study point was located downstream about 34 Km from the first place, after the confluence of the São Francisco river with the Abaeté river, referential site (Site 2, Fig. 1). The overall results for biometric values of all animals at both sites were expressed as average and standard error. Immediately after the capture, the specimens were killed by cervical section according protocol 065/05 approved by CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal of the Universidade Federal de Minas Gerais). Each animal had its biometric data obtained to determine both the condition factor (CF) obtained by formula:  $CF = \text{body weight} / \text{total length}^3 \times 100$ , according to Tavares-Dias et al. (2000) and the hepatosomatic index (HSI) according to the formula described by Nikolsky (1963):  $HSI = \text{liver weight} / \text{body weight} \times 100$  (Table 1).

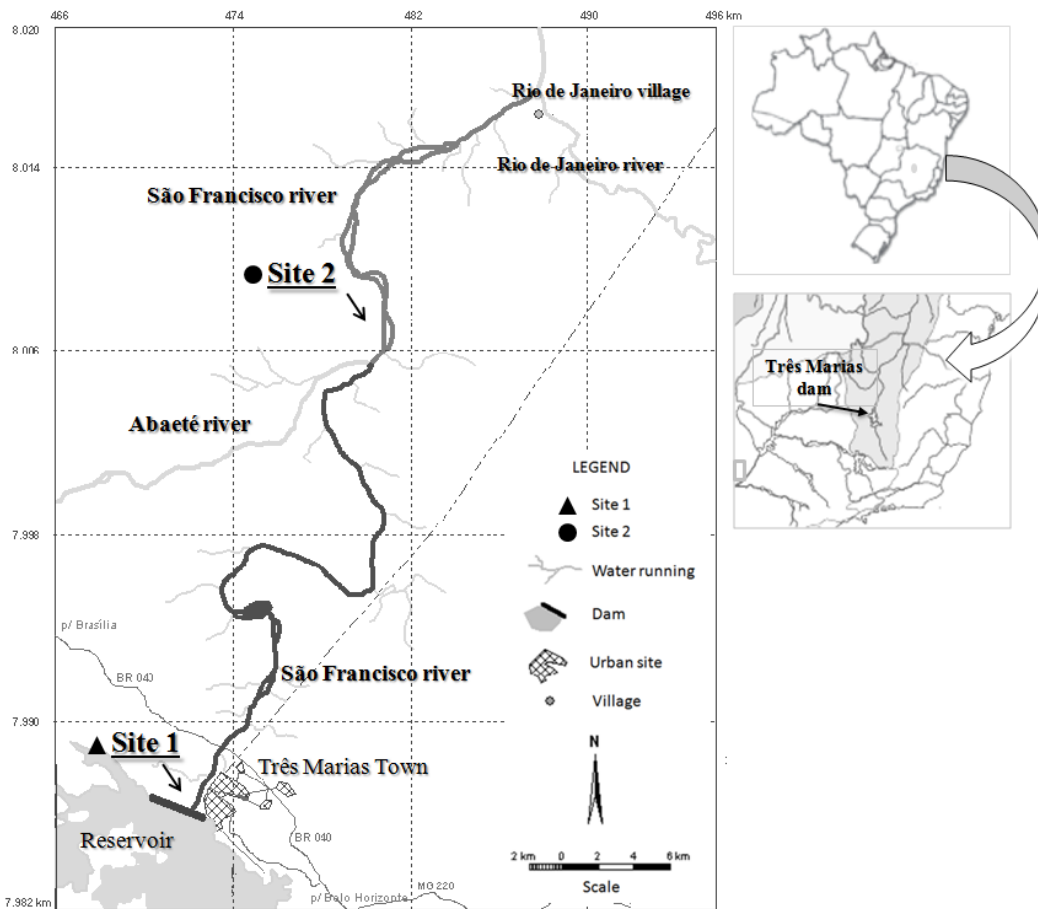


Figure 1. Sites of collection showing the Três Marias dam region, São Francisco and Abaeté river.



### *Water sampling*

In each studied sites, tree points were determined for collect. In these places polyethylene bottles of 500 ml containing 2 ml of nitric acid solution at 10% were submerged in the vertical to 10 centimeter of the surface the water. These bottles were previously decontaminated in 10% nitric acid solution for 48 hours. The samples were taken to laboratory and filtered through a membrane filter of 45 µm for determination of the metals presence (As, Fe, Cr, Mn, Cu, Zn, Cd). The analysis was performed in Analyst 400 atomic absorption spectrometry equipment with graphite furnace HGA 900 (GF AAS) Perkin Elmer (Norwalk, CT USA). For each sample tree analyzes was performed. At the same time of the collect, water parameters such as pH, temperature (WT), electric conductivity (EC), turbidity (T) and oxygen dissolved (OD) were measurements by Horiba U-10 multi-probes.

### *Sediment sampling and processing*

In addition to water collection, bottom sediment was collected using hand dredger in the same points. The slurry was conditioning in polyethylene pots previously decontaminated in 10% nitric acid solution for 48 hours. The samples ware maintained in refrigerator at 10 °C until the atomic absorption spectrometry processing. The sediment samples were dried at 60 °C for 24 hours. After drying, samples were triturated in a ceramic mortar and passed through sieve with opening of 65 µm. Suspensions were prepared by weighing the mass variables (10-100 mg) of sediment directly into the auto-sampler cup atomic absorption spectrometer equipment. Similarly to water analyzes, the determination of the metals presence (As, Fe, Cr, Mn, Cu, Zn, Cd) in sediments samples were archived using an apparatus for atomic absorption spectrometry with graphite furnace (GF AAS) Analyst 400 equipment with graphite furnace HGA 900 (Perkin Elmer -Norwalk, CT USA). Similarly to water approach, three analyzes were carried for samples.

### *Procedure for histological and histochemical characterization*

Liver fragments obtained from the same anatomical portion were fixed in Bouin's fluid for 24 hours. Following fixation, fragments were maintained in 70% ethanol until processing for paraffin embedding. For each animal, 12 sequential sections (6µm) were obtained. The slides were stained sequentially by Hematoxilin-Eosin (H&E) and Perls techniques (Luna 1968; Blazer 2002). A total of three glass slides per animal were used for each technique.

### *Procedure for morphological and histochemical analysis*

The H&E stained and histochemically labeled materials were analyzed under light microscopy by using the Olympus BX41 microscopy in order to show the possible different in morphology characteristics of the liver parenchyma and MMC from *P. argenteus* collected in the two different sites. For H&E samples, three scores (similar to the procedure described by Melo, Donatti, Rudniki & Fanta 2008) were applied to determine the intensity of the characteristics such as: nuclear displacing, cytoplasmic vacuolization, hyperemia, occurrence of cytoplasmic pigment-containing granules and

necrotic areas. For all items studied, ten fields from each histological slide were randomly chosen. A 40x objective was used for identifying nuclear displacing, cytoplasmic vacuolization, presence of cytoplasmic granules and necrosis areas while a 10x objective was used for the hyperemia analysis.

According to the intensity of occurrence, the parameters were considered as: low occurrence - when there were no alterations; medium occurrence - when the alterations were observed in less than 50% of the analyzed area; and high occurrence - when the alterations were observed in more than 50% of the area. For the cytoplasmic granules, intensity occurrence was classified as: low occurrence - when there was no one or one visible granule per hepatocyte nuclei in the field; medium occurrence - when there were less than three visible granules per hepatocyte nuclei; high occurrence - when more than three or more granules were observed per hepatocyte nuclei.

#### *Morphometrical analysis of MMC*

To detect possible correlations among the tissue features and the MMC characteristics such as size, the relative total area occupied by MMC of animals in two each Sites and the relative area occupied by each pigment containing granules, samples were submitted to the Perls histochemistry technique and analyzed as described below. Estimation of tissue total area and the relative MMC total area - The tissue total area and the relative MMC total area were calculated through digitalized images obtained with the Olympus BX41 light microscope coupled to a digital camera Q-Color 3 Olympus integrated Image-Pro analysis software. A microscopic system consisting of 2.5x objective and a 2.2x projective lens was used for estimating the total tissue area, and a 40x objective and a 3.3x projective lens were used for the relative MMC total area estimation. The digitalized image calibrations were performed using a 0.01mm micrometer ruler. For MMC pigment-containing granules quantification, a slide stained by Perls technique from each specimen was analyzed aiming to determine the percentage occupied by each type of pigment-containing granule. For this purpose five MMC images per animal were digitalized using 40x objective according to the procedure previously described. For this approach, the MMC images were segmented in red, blue and green colors (corresponding to melanin, hemosiderin, and lipofuscin areas, respectively); the area without granules was also measured.

#### *Procedure for transmission electron microscopy (TEM)*

Samples of liver fixed in Karnovsky solution (glutaraldehyde 2.5% and paraformaldehyde 2% in sodium cacodylate buffer 0.2 M, pH 7.3). After fixation the specimens were rinsed three times in sodium cacodylate buffer 0.1 M, and post-fixed with 1 % osmium tetroxide in 2 % potassium ferrocyanide for 2 hours in dark place. The samples were dehydrated in ascending concentrations of acetone, and embedded in Poly Bed 812 resin (Polyscience®). Ultrathin sections of 80nm were obtained in LKB ultramicrotome, mounted on copper grids, and stained with uranyl acetate for 10 minutes, and lead citrate for 5 minutes. Sections were examined with a Zeiss-EM10 transmission electron microscopy at 80 keV.

#### *Statistical analysis.*

Nonparametric test of Mann-Whitney was used to analyze CF, HSI, MMC relative areas and the percentage of the different types of pigment-containing granules

within MMC of the animals caught in the two sites. The data were tested using confidence interval at 95% ( $p < 0.05$ ).

### 3. RESULTS

#### CONDITION FACTOR (CF) AND HEPATOSOMATIC INDEX (HSI)

No significant difference was detected in total length and body size of specimens captured in site 1 and site 2. the condition factor (cf) average values for all animals caught in site 1 was lower than site 2, while the (his) showed no significant difference in the animal from different studied sites (FIG 2).

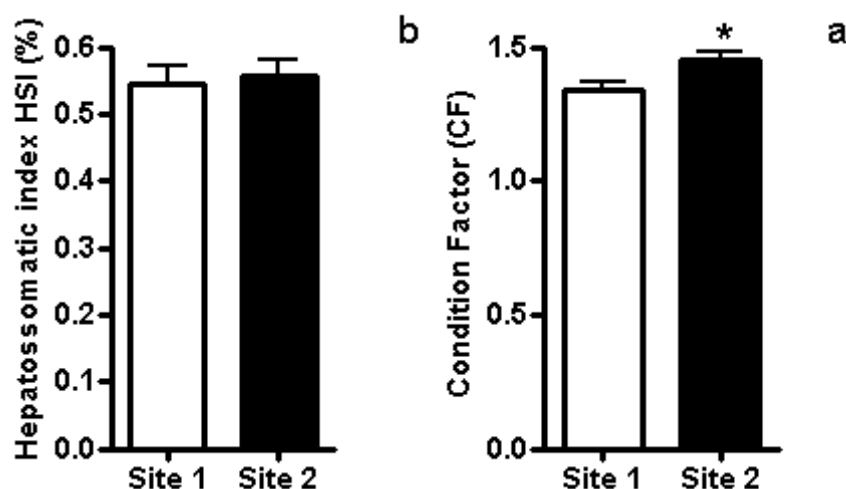


Figure 2. CF (a) and HSI (b) values for animal from different studied sites. (\*) indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ).

#### Physical-chemical parameters of water

The values for pH, temperature and dissolved oxygen were lower in Site 1 than Site 2, while turbidity e and electric conductivity appeared highest values then compared to Site 2. The values were expressed in average and standard error (Fig 3).

|        | pH          | Temperature  | Dissolved oxygen | Turbidity    | Electric conductivity |
|--------|-------------|--------------|------------------|--------------|-----------------------|
| Site 1 | 6.16 ± 0.06 | 22.9 ± 0.06  | 8.1 ± 0.05       | 6.9 ± 3.0    | 21.4 ± 6.7*           |
| Site 2 | 6.6 ± 0.08* | 23.3 ± 0.25* | 8.7 ± 0.04*      | 44.9 ± 17.6* | 5.7 ± 0.17            |

Figure 3. Values of physico-chemical (pH, temperature, dissolved oxygen, turbidity and conductivity) of water of the two sites studied. (\*) indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ).

## METALS IN WATER AND SEDIMENT

Through of atomic absorption spectrophotometry analyzes, the concentrations of metals (As, Cd, Cu, Mn, Zn) were establish. In water samples collected in Site 1 the was determined a higher concentration of Cd, Mn and Zn than Site 2. Similarly in sediment samples, As, Cd, and Cu also were higher in Site 1 (Fig 4).

|          |        | As           | Cd           | Cu         | Mn             | Zn             |
|----------|--------|--------------|--------------|------------|----------------|----------------|
| Water    | Site 1 | nd           | 2.99 ± 0.7 * | nd         | 213.6 ± 25.9 * | 101.1 ± 2.14 * |
|          | Site 2 | nd           | nd           | nd         | 139.1 ± 1.85   | 16.7 ± 1,49    |
| Sediment | Site 1 | 50.4 ± 3.4 * | 5.15 ± 1.6 * | 11.6 ± 1.7 | 36.1 ± 12.4    | nd             |
|          | Site 2 | 18.2 ± 1.2   | 0.62 ± 0.25  | 5.58 ± 0.3 | 45 ± 8.8       | nd             |

Figure 4. Values of metals concentrations in water ( $\mu\text{g/L}$ ) and sediment ( $\text{mg/Kg}$ ) between the two sites studied. (\*) indicate statistical difference ( $p < 0.05$ ), (nd) not detected.

## D. HISTOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL ANALYSIS

The *P. argenteus* hepatic parenchyma is externally covered by a tinny connective capsule containing hepatocytes in double layered anastomosed tubular arrangement longitudinally crossed by a narrow sinusoidal capillary vessel (Fig 5a). The hepatocytes of the animals collected from the site 1 had vacuolization of the cytoplasm in different degrees suggesting turbid tumefaction and hydropic degeneration associated to angiectasia and hyperemia (Fig 5b). Hepatitis (Fig 5c) and necrosis (Fig 5d) also were more evident. In Site 2 animals, the hepatocytes frequently showed typical central nucleus, moderate basophilic cytoplasm without vacuolization containing frequent irregular shaped intracytoplasmic hepatic granules (IHG), (Fig 5a).

The liver of animals caught in Site 1 revealed histopathological alterations including displaced nuclei, cytoplasm vacuolization, hyperemia and necrosis. Animals from Site 2, these alterations had low occurrence associated with the higher presence of IHG. A semi-quantitative assessment these alterations indicated that livers of fish collected from Site 1 were more affected than the animals collected in Site 2 (Fig 6).

The PAS, Perls and Von Kossa histochemical analysis in the *P. argenteus* liver materials allowed the characterization of the labeling distributions for carbohydrates, hemosiderin, lipofuscin and calcium salts in hepatocytes and MMC. The PAS histochemistry showed labeled deposits in hepatocytes and in MMC. In animals from Site 1, labeling appeared frequently inside the hepatocytes as single points, in clusters and in IGH granules. In the latter, however, the labeling was weak compared to the intracellular macrophages (MMC) granules (Fig 7a). In the hepatocytes from site 2, the labeling was moderately dispersed in the weakly labeled cytoplasm of the IHG and intensely labeled in macrophage granules (Fig 7b). The macrophage granules labeling was present in all animals but labeling was less intense in animals from site 1.

Liver stained by Perls technique displayed variable amounts of hemosiderin and lipofuscin pigments in IHG and MMC granules. In the MMC, hemosiderin and lipofuscin labeling was found to be associated with the MMC granules more intensely in animals from Site 2 (Fig 7c). Lipofuscin labeling was predominantly found in IHG

and in MMC granules of animals from site 1 (Fig 7d). The melanin pigment labeling was rarely found in the granules of *P. argenteus* liver. Labeling of calcium salts as determined by von Kossa histochemical technique was found to be restricted to the MMC granules and were more abundant in animals from Site 2 (Fig7c).

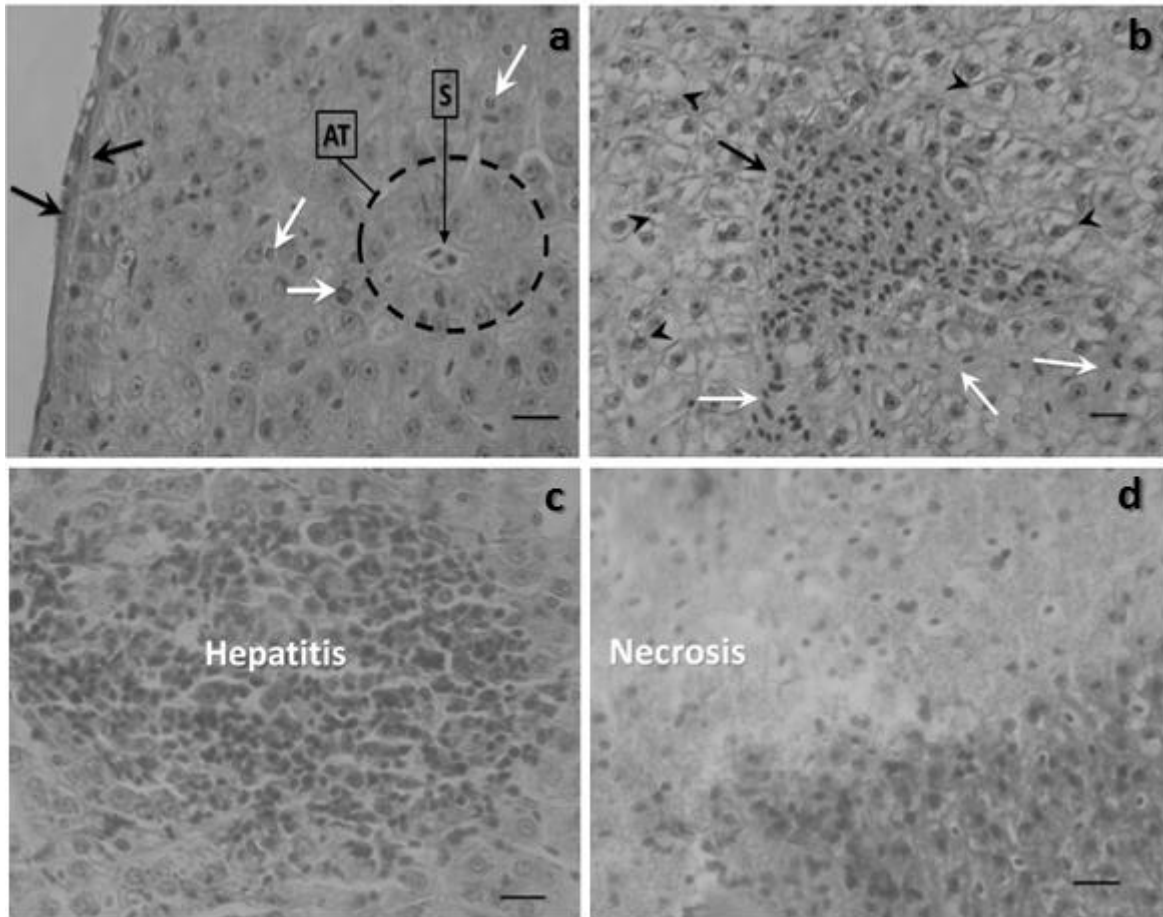


Figure 5. Liver sections micrographs of *Prochilodus argenteus* collected in Site 2 (a) and site 1 (b, c and d). Note in a, connective capsule (black arrows), hepatocytes in anastomosed tubular arrangement (AT) crossed by sinusoidal capillary containing sectioned blood cells (S). Note occurrence of IHG (white arrows) inside hepatocyte. In b, note angiectasia and hyperemia into the blood vessel (black arrow) and sinusoidal capillary (white arrow), turbid tumefaction and hydropic degeneration (arrowhead), and absent of intracytoplasmic hepatic granule (IHG). Hepatitis are depicted in c and extensive normal structure disruption and basophilic liquefied aspect resembling necrotic areas in d. Hematoxylin-Eosin staining. Bar = 16.2  $\mu\text{m}$ .

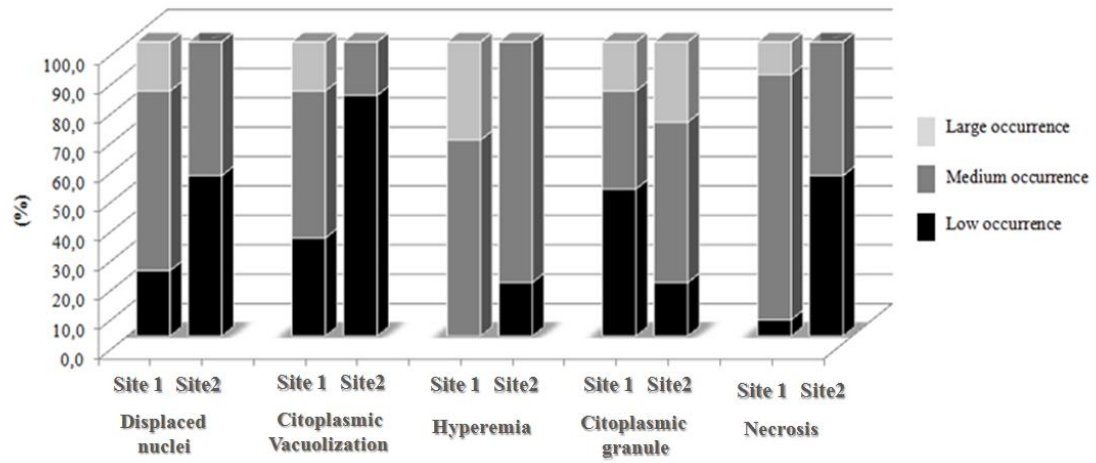


Figure 6. Occurrence (%) of morphological alterations in the liver of *Prochilodus argenteus* at the two sites of collection.

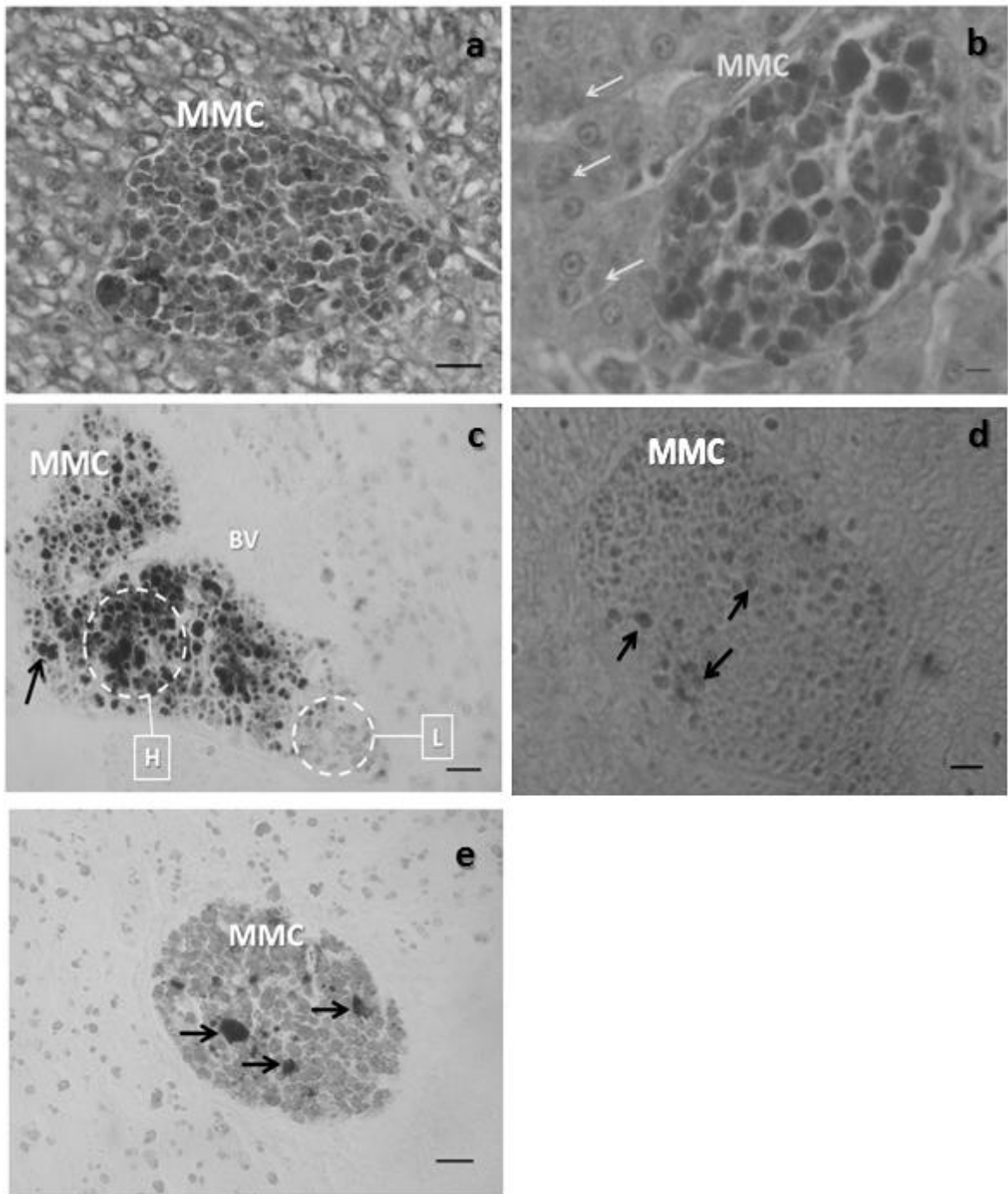


Figure 7. Light micrographs of different histochemical techniques used in the *Prochilodus argenteus* liver. Observe in **a**, **d** and **e** (Site 1) and **b** and **c** to Site 2. In **a**, PAS histochemistry, showing few labeling inside hepatocytes and melanomacrophage center (MMC). In **b**, labeling is dispersed in hepatocytes cytoplasm (arrow) and intense in MMC. In **c**, Perls technique displays labeling of the melanin (arrow), hemosiderin (H) and lipofuscin (L) in pigments containing granules of MMC. Note in **d**, the predominant lipofuscin pigments containing granules and the low occurrence of hemosiderin (arrow) Observe in **c**, von Kossa histochemical techniques showing presence of calcium in MMC granules containing pigments (arrows). **a** bar = 16.2  $\mu\text{m}$ ; **b**, **c**, **d** and **e** bar = 6.8  $\mu\text{m}$ .

*D. Morphometrical analyses*

The mean number for MMC/ $\text{mm}^2$  of the *P. argenteus* liver was five. No

difference ( $p>0.05$ ) was found between the MMC/mm<sup>2</sup> number in the two sites. Two distinct groups of MMC were arbitrarily characterized in the curimatã-pacu liver. These groups were denominated as “small MMC” ( $< 0.01$  mm<sup>2</sup>) and large MMC ( $> 0.01$  mm<sup>2</sup>) (Figs 8a and 8b) The large MMC ranged from 0.01 mm<sup>2</sup> to 0.024 mm<sup>2</sup>. The number MMC per tissue analyzed area do not presented difference among the sites of study (Fig 9a). However, the large MMC were more frequent ( $p<0.05$ ) in site 2 animals when compared to site 1 (Fig. 9b).

Regardless of the site, lipofuscin granules were predominant in small MMC while hemosiderin granules were more abundant in large MMC (Fig 10). In the large MMC group, 45.6% of total area was filled with hemosiderin granules while in small MMC these granules represented about 10% of the total area. The area without granules was higher in small MMC than large MMC.

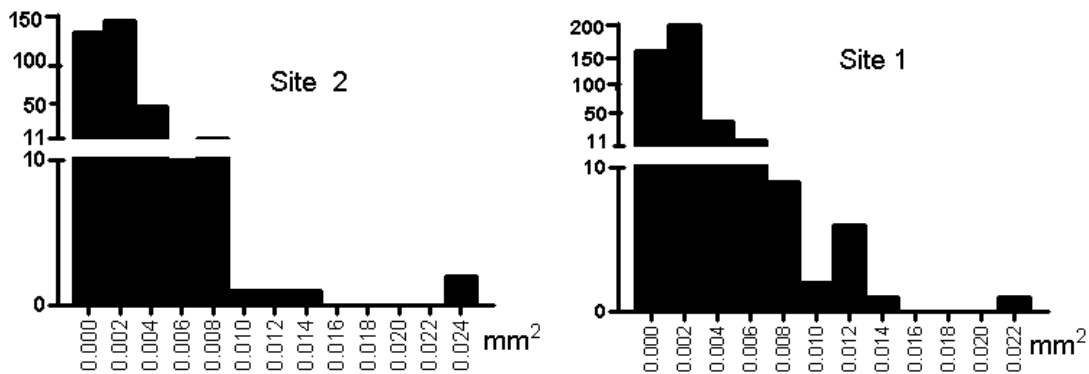


Figure 8. The graph shows the MMC frequency distribution in the liver of animals at the two sites of collection

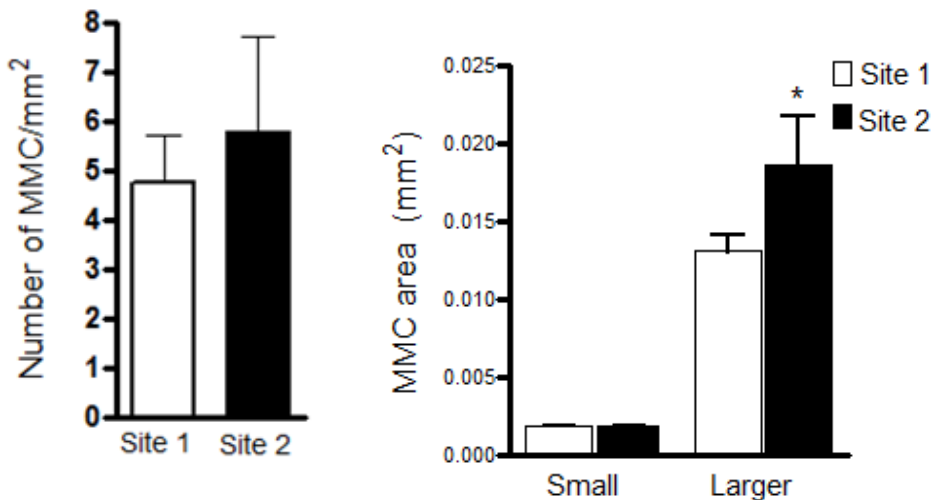


Figure 9. Illustration of melanomacrophage centers (MMC) morphometrical analysis. The number of liver MMC per area (MMC/mm<sup>2</sup>) and the area (mm<sup>2</sup>) of small and large MMC of *Prochilodus argenteus* at the two sites of collection are shown in A and B, respectively. (\*) indicates significant difference ( $p<0.05$ ) between the two sites.



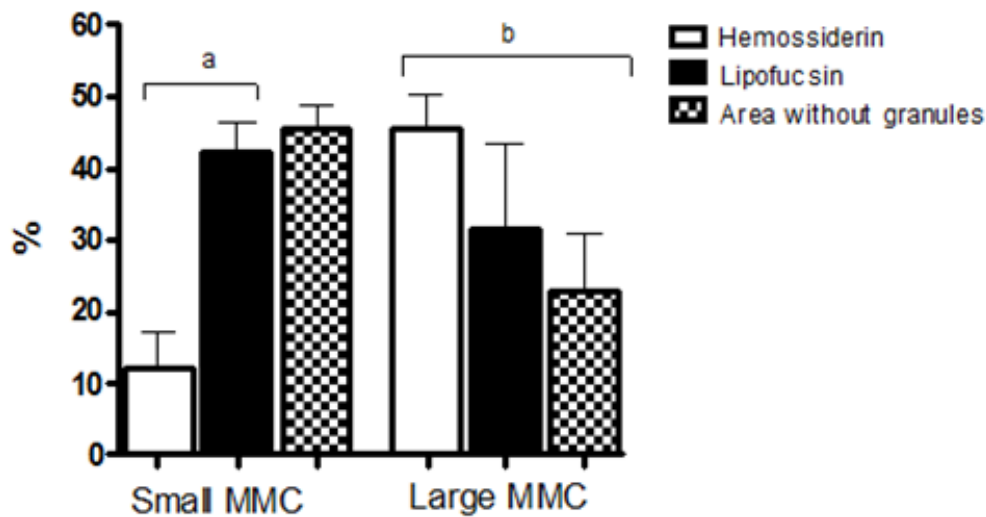


Figure 10. Graph shows the types (%) of granules containing pigments in small and large MMC of *Prochilodus argenteus*. (a) indicates significant difference ( $p < 0.05$ ) between lipofucsin and hemosiderin and (b) denotes significant difference ( $p < 0.05$ ) among hemosiderin, lipofucsin and area without granules

#### E. Transmission electron microscopy (TEM)

Likewise to findings in light microscopy (LM), important differences were observed between animals of two sites of study. In Site 1, the ultra structure of the liver allows to observe hepatocytes appearing cytoplasm displayed swollen aspect associated with the presence of water, suggesting cellular swelling (Fig 11a). In the same animals we observed reticulum showing dilated rough endoplasmic cisterns, accompanied dilated mitochondria, with disruption of their mitochondrial crests besides concretions of calcium deposits (Fig 11b). On the other hand in animals collected in Site 2, the hepatocytes showed typical appearance with well preserved cellular organelles. The nuclei appear peripheral heterochromatin and prominent nucleoli evident surrounded by a large area containing rough endoplasmic reticulum, mitochondria, endosomes, lysosomes, and large amounts of glycogen granules, suggesting high ultra structural preservation (Figs. 11c and 11d).

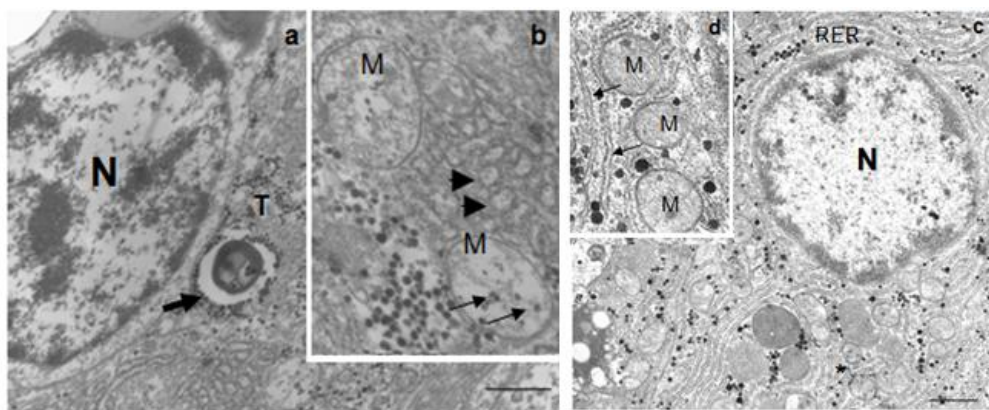


Figure 11. Electron micrographs of hepatocytes of *P. argenteus* liver. In **a**, magnification of a hepatocyte from a specimen collected in the Site 1. Observe nucleus

(N) and cytoplasm showing swollen aspect (T) indicating the process of cell swelling. Note the presence of myelinic body (arrow). In detail in **b**, observe mitochondria showing flocculation (M) and swollen typical aspect accompanied by dilatation of cisterns of rough endoplasmic reticulum (arrowheads). In **c**, electron micrograph of a hepatocyte of animal from Site 2. Observing network of rough endoplasmic reticulum (RER) in the perinuclear region looking healthy. Note large amount of glycogen in black. In particular in **d**, spherical mitochondria (M) showing preservation of the cistern. **a** and **c**, bar = 0.2  $\mu\text{m}$ , **B** and **D** bar = 0.11  $\mu\text{m}$ .

#### **4. DISCUSSION**

As reported for Bruslè & Anadon, (1996) and Rocha, Rocha, & Monteiro (2003), the liver is a key organ for breeding and target metabolization. The somatic tissue indices, such as, hepatosomatic index (HSI), and condition factor (CF), have been considered as important tools for the assessment of the general conditions of health and status metabolism of teleost fish (Adams & McLean 1985; Tavares-Dias et al. 2000). In *P. argenteus*, contrary to that observed for CF, the different environmental conditions between the Sites apparently did not affect the HSI. The same result observed for females were achieved for male specimens of the *P. argenteus* for both CF and HSI (data not shown). These data indicate that, in our study, the HSI was not able to display differences between the sites. Other factors acting on the CF in the present study could not be ruled out, whilst factors, such as temperature (Handeland, Wilkinsonb, Sveinsboaa, McCormickc & Stefansson 2004; Kopekca & Pempkowiak, 2008; Luckenbach, Murashige, Daniels, Godwin & Borski 2007), pollutants (Evans et al. 2000) and heavy metals (van Dyk et al. 2007) have been said to affect the CF and HIS indices.

Static exposures of fish to nominal concentrations of contaminants are usually unrealistic when attempting to relate toxicity results to field assessment of environment. Studies aiming to relate morphological changes on environmental conditions should be aware of two important factors: First a characterization of the normal tissue cytoarchitecture should be previously established. Second, a determination of the parameters physical-chemical of the water, associated a xenobiotic, such as heavy metals, is essential (Rocha & Monteiro, 1999; Fishelson, 2006; Akiyoshi & Inoue, 2004; Figueredo-Fernandes, Fontáinhas-Fernandes, Monteiro, Reis-Henriques & Rocha 2006).

In the present study, the *P. argenteus* liver cytoarchitecture is described for the first time and is characterized by a non lobular structure containing hepatocytes in a tubular anastomosed fashion with MMC associated mainly at the periphery of associated vessels and biliary ducts. Addition to this characterization the establishment for physical-chemical parameters of the water showed unfavorable conditions principally for temperature and dissolved oxygen in Site 1 than Site 2. Likewise the concentration of have metals was higher in water and sediment collected in Site 1 than Site 2.

Low dissolved oxygen levels and low water temperature are mentioned (Haman, Zwingelstein & Weber 1997) as factors for the increase in the plasma glucose levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, which alter the normal function and affect the cell structural integrity. In *P. argenteus* this reaction could justify the PAS and von Kossa low histochemical labeling in hepatocytes and MMC from Site 1.

As to the histological aspect, the lower health status indicated in Site 1 specimens is followed by cytochemical findings such as less intense labeling for

carbohydrates and calcium salts. Therefore a carbohydrate imbalance could impair the vitelogenin (a lipo-carbohydrate-protein essential for ovules formation) synthesis necessary for the reproductive cycle. (Kime 1999).

The general structural aspect of the liver in *P. argenteus* displays marked differences in histological and histochemical features of the liver related to the different Sites of collection, thus indicating that the histological approach herein used for the liver is highly sensitive to the environmental conditions downstream to the Três Marias dam. In liver from Site 1, morphological alterations such as vacuolization, displaced nuclei, hyperemia, inflammations and necrosis were more frequent than in Site 2. Similarly the findings of the light microscopy, the ultra structure of the liver showed striking differences between the animals of two studied sites. (Rabitto et al.; 2005 Gurcu, Yildiz, Koca & Koca 2010).

The MMC occurrence can be a good marker of tissue exposed to diverse stress agents (Rabitto et al. 2005). Some authors have demonstrated that MMC in organs, such as liver, kidney, spleen and intestine increase in size and/or frequency when exposed to heavy metals, alkaloid and, environmental stress (Fournier 2006; Agius & Roberts 2003; Glencross, Evans, Rutherford, Hawkins, McCarfferty, Dods, Jones, Harris, Morton L, Sweetingham & Sipsas 2006; Fishelson 2006). No differences concerning these aspects were found in the present study. However the occurrence of the pigments containing-granules such as melanin, hemosiderin and lipofuscin within MMC can be an indication of their metabolic function (Wolke 1992; Aguis & Roberts 2003). The lipofuscin is associated to imbalance of cellular turn over, involving lisosomal activity, lipid membrane peroxidation, metals loads (Pickford 1953), while hemosiderin is associated to red blood cell breakdown and iron storage processes (Aisen, Enns & Wessling-Resnick 2001). In our study, lipofuscin was predominant in the MMC smaller than  $0.010 \text{ mm}^2$  whereas in the MMC larger than  $0.010 \text{ mm}^2$ , iron rich hemosiderin was the prevalent pigment. These results may suggest that, at least in *P. argenteus* liver, all MMC do not appear to have the same metabolic function. The substantial difference in chemical composition obtained from different MMC populations of *P. argenteus* liver indicates that MMC can perform distinct functions that could be related to its size. Therefore, it is suggested that small MMC are related to the cellular turn over due to the lipofuscin predominance and large MMC are associated to iron storage and mobilization processes.

Intracytoplasmatic hepatic granules (IHG) containing calcium precipitates have been described in organisms of several trofic levels (Taylor & Simkiss, 1989; Corrêa Junior, Farina & Alodi 2003; Corrêa Jr, Bruno, Allodi & Farina 2009). The presence of dense granules in IHG in teleostei fishes has been associated to the storage and the difficulty to eliminate products (Haaparanta et al. 1996; Rabitto et al. 2005). Our results show that in *P. argenteus* liver, the greater incidence of granules containing more iron and carbohydrate contents was in Site 2 which was characterized by better health conditions. These granules could be acting as storage structures.

Overall, this study demonstrates that in *P. argenteus* female liver, the histological features shows clear differences in histological, histochemical and compositional analysis among specimens collected from two different sites in São Francisco river, downstream from the Três Marias dam. The high sensitivity of the morphological, histochemical and ultra structural approaches of the fish liver can be a powerful tool for the determination of the stress parameters for the aquatic environment systems.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

This work received financial support from CNPq and FAPEMIG (Brazilian Agencies for Science and Technology). The authors are also grateful to the following Brazilian Institutions: Hidrobiologia and Hatchery Station of Três Marias and CODEVASF/CEMIG convention for the assistance in fish sampling.

## 6. REFERENCES

Abedel-Tawwab M., Mousa M.A.A., Ahamad M.H. & Sakr S.F.M. (2007) The use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture* 264, 236–246.

Adans S.M. & McLean R.B. (1985) Estimation of largemouth bass, *Micropterus salmoides* Lacépède, growth using the liver somatic index and physiological variables. *Journal Fish Biology* 26, 111-126.

Agius C. & Roberts R.J. (2003) Melano-macrophage centres in their role in fish pathology. *Journal Fish Diseases* 26, 499-509.

Akiyoshi H. & Inoue A. (2004) Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zoological Science*. 21, 841-850.

Aisen P., Enns C. & Wessling-Resnick M. (2001) Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33, 940–959.

Ayas Z., Ekmekey G., Ozmen M. & Yerli S.V. (2007) Histopathological changes in the liver and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23, 242-249.

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

Blazer V.S. (2002) Histopathological assesment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 85-101.

Bruslè J. & Anadon G.G. (1996) Production. In: The structure and functions of fish liver. In (ed. by Munshi and Dutta), pp. 77-93. Horizon of New Research, Science Publisher Inc., New Hampshire

Caballero M.J., Izquierdo M.S., Kjorsvik E., Fernández A.J. & Rosenlund G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short-or long- term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases* 27, 531-541.

Corrêa Junior J.D., Farina M. & Allodi S. (2003) Enzymatic, analytical and structural aspects of electron dense granules genesis in *Ucides cordatus* (Crustacea Decapoda) hepatopancreal cells. *Cell and Tissue Research* 311, 107-116.

Corrêa Jr J.D., Bruno M.I. Allodi S. & Farina M. (2009) Effects of H<sup>+</sup> concentration on amorphous mineral granules: Structural stability and elemental mobilization. *Journal of Structural Biology* 166, 59-66.

Diniz M.S., Peres I. & Pihan, J.C. (2005) Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. *Science of The Total Environment* 349, 129-139.

Evans C.W., Hills J.M. & Dickson J.M.J. (2000) Heavy metal pollutions in Antarctica: A molecular ecotoxicological approach to exposure assessment. *Journal of Fish Biology* 57, 8-19.

Figueiredo-Fernandes A.M., Fontainhas-Fernandes A.A., Monteiro F.A.F., Reis-Henriques M.A. & Rocha E. (2006) Temperature and Gender influences on the hepatic stroma (and associated pancreatic acini) of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* (teleostei, cichliadae): A stereological analysis by light microscopy. *Journal of Morphology* 267, 221-230.

Fishelson L. (2006) Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney and liver in Cardinal fish (*Apogonidae teleostei*) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology* 267, 57-69.

Fournie J.W., Summers J.K., Courtney L.A. & Engle V.D. (2001) Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 105-116.

Glencross B., Evans D., Rutherford N., Hawkins W., McCarfferty P., Dods K., Jones B., Harris D., Morton L., Sweetingham M. & Sipsas, S. (2006) The influence of the dietary inclusion of the alkaloid gramine, on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth, feed utilization and gastrointestinal histology. *Aquaculture* 253, 512-522.

Graf W.L. (1999) Dam nation: A geographic census of American dams and their large-scale hydrologic impacts. *Water Resources Research* 35, 1305-1311.

Gurcu B., Yildiz S., Koca Y.B. & Koca S. (2010) Investigation of histopathological and cytogenetic effects of heavy metals pollutions on *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) in the Golmarmara Lake, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9, 798-808.

Haaparanta A., Valtonen E.T., Hoffmann R. & Holmes J.(1996) Do macrophage centres in freshwater fishes reflect in the differences in water quality? *Aquatic Toxicology* 34, 253-272.

Haman F., Zwingelstein G. & Weber J.M. (1997) Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are

misleading. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 273, 2046-2054.

Handeland S.O., Wilkinson E., Sveinsbøa B., McCormick S.D. & Stefansson S.O. (2004) Temperature influence on the development and loss of seawater tolerance in two fast-growing strains of Atlantic salmon. *Aquaculture* 233, 513-529.

Hartley W.R., Thiyagarajah A. & Treinies A.M. (1996) Liver lesions in the Gar Fish (Lepisosteidae) as biomarkers of exposure. *Marine Environmental Research* 42, 217-221.

Kime D.E. (1999) Environmentally induced endocrine abnormalities in fish. *Environmental Science & Technology* 12, 27-48.

Kopecka J. & Pempkowiak J. (2008) Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 379-391.

Leknes I.L. (2004) Melano-macrophage centres in the liver of platyfish, *Xiphophorus maculatus*, Poeciliidae: teleostei. *Zoology* 107, 201-204.

Luckenbach J.A., Murashige R., Daniels H.V., Godwin J. & Borski R.J. (2007) Temperature affects insulin-like growth factor I and growth of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma*. *Comparative Physiology and Biochemistry* 146, 95-104.

Lukin A.A. & Sharova Y.N. (2004) Water quality estimation based on histological investigations of fish: case study of Kenozero Lake. *Water Research* 31, 443-449.

Luna L.G. (1968) Production. In: *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology* (ed. by L.G. Luna), pp. 38-39. California.

Marchand M.J., van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., Barnhoorn I.E.J. & Bornman, M.S. (2009) Histopathological alterations in the Liver of the Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in South Africa. *Environmental Toxicology* 24, 133-147.

Matos P., Fotaínhas-Fernandes A., Peixoto F., Carrola J. & Rocha E. (2007) Biochemical and histological hepatic changes of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to carbaryl. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 89, 73-80.

Mela M., Randi M.A.F., Ventura D.F., Carvalho C.E.V., Pelletier E. & Oliveira Ribeiro, C.A. (2007) Effects of the dietary methylmercury on the liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 426-435.

Melo G.C., Donatti L., Rudniki C.A.M. & Fanta E. (2008) Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600<sup>®</sup>. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 821-829.

Neto F.F., Zanata S.M., Silva de Assis H.C., Bussolaro D., Ferraro M.V.M., Randi M.A.F., Costa J.R.M.A., Cestari M.M., Roche H. & Oliveira Ribeiro C.A. (2007) Use of hepatocytes from *Hoplias malabaricus* to characterize the toxicity of a complex mixture of lipophilic halogenated compounds. *Toxicology in Vitro* 21, 706-715.

Nikolsky G.V. (1963) Production In: The ecology of fishes. Publisher Academic Press, London

Pickford G.W. (1953) Production. In: Fish endocrinology a study of the hypophysectomized male killfish, *fundulus heterocitus* (l). Bulletin of the Bigam Oceanographic Collection. Yale University, 5-41.

Rabitto I.S., Alves Costa J.R.M., Silva de Assis H.C., Pelletier E., Akaishi F.M., Anjos A., Randi M.A.F. & Oliveira Ribeiro, C.A. (2005) Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 147-156.

Roberts R.J. (1975) Production. In: Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. (ed. by Ribelin W.E. & Migaki G.), pp. 399-428WI. Publisher University of Wisconsin Press, Madison,

Rocha, E. & Monteiro R.A.F. (1999) ) Production. In: Histology and cytology of fish liver: a review. (ed. by Ibh Publishing), pp. 321-344. Publisher, Oxford.

Rocha E., Rocha M.J. & Monteiro R.A.F. (2003) ) Production. In: Seasonal changes in fish hepatocytes and correlations with the endocrine system. (ed, by Fish Adaptations), pp. 384-403. Sience Publisher.

Sampaio E.V. & López C.M. (2003) Production In: Limnologias física, química e biológica da represa de Três Marias e do São Francisco. (ed. by Godinho & Godinho), pp. 71-92. Publisher PUC Minas, Belo Horizonte.

Sato Y. & Godinho H.P. (2003) Production. In: Migratory fishes of the São Francisco River. (ed. by Harvey J., Ross B. & Baer A), pp. 195-232 Publisher World Bank, Victoria.

Sato Y., Bazzoli N., Rizzo E., Boschi M.B. & Miranda M.O.T. (2005) Influence of the Abaeté River 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* 21, 939-950.

Taylor M.G. & Simkiss K. (1989) Production In: Structural and analytical studies on metal ion-containing granules. (ed. by Mann S., Webb R.J. & Williams R.J.P), pp. 427-460. Biomineralization, Chemical and Biochemical Perspectives. Publisher VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Tavares-Dias M., Martins M.L. & Moraes F.R. (2000) Relação hepatossomática e esplenosomática em peixes teleósteos de cultivo intensivo. *Revista Brasileira de Zoologia* 17, 273-281.

van Dyk J.C., Pieterse G.M. & van Vuren J.H.J. (2007) Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66, 432-440.

Wolf J.C. & Wolfe M.J. (2005) A Brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology* 33,75-85.

Wolke R.E. (1992) Piscine macrophage aggregates: A review. *Annual Review of Fish Diseases* 91-108.



1. CERTIFICADO CETEA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL (CETEA)

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº **065/05** relativo ao projeto intitulado "*Estudo morfofuncional de grânulos eletrondensos em sistemas biológicos por microscopia eletrônica analítica*", que tem como responsável José Dias Corrêa Junior, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo *Comitê de Ética em Experimentação Animal* (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado em reunião de **09.11.2005**.

Este certificado expira-se em **09.11.2010**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **065/05** related to the project entitled "*Morphological and functional study of electron dense granules in biological systems by analytical electron microscopy*", under the supervision 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 **09.11.2005**.

This certificate expires in **09.11.2010**.

Belo Horizonte, 29 de novembro de 2005

  
**Dra. CLEUZA MARIA F. REZENDE**  
PRESIDENTE DO CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais -Reitoria – Campus Pampulha  
Avenida Antônio Carlos 6627-7 Andar CEP: 31270-901 - Belo Horizonte MG-Brasil  
Telefone: (31) 3499-4592 – Fax: (31) 3499-4027 – Home page: [www. ufmg.br/prpq/cetea](http://www.ufmg.br/prpq/cetea)-  
Email – [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**PROCOLOS**

## 2. PROTOCOLOS.

### 2.1 - Histoquímica de Perls

Fixador: Bouin ou Formol 10%

#### a) Solução A

Ferricianeto de potácio.....4 g

Água destilada.....100 ml

#### b) Solução B

Ácido clorídrico                      50 ml

Água destilada.....50 ml

*As soluções devem ser preparadas e misturadas na hora do uso*

Procedimento:

#### 1. Desparafinar

Xilol I    20 min

Xilol II   20 min

#### 2. Hidratar

Álcool absoluto I    5 min

Álcool absoluto II   5 min

Álcool 90°            5 min

Álcool 80°            5 min

Álcool 70°            5 min

#### 3. Passar água corrente

4. Tratar as lâminas por 20 minutos com a solução (A+B) recém preparadas e misturadas

5. Lavar em água destilada por 3 vezes

6. Contra corar os núcleos péla Safranina por 5 minutos (opcional)

#### 7. Desidratar

Álcool 70°            5 min

Álcool 80°            5 min

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Álcool 90°         | 5 min |
| Álcool absoluto I  | 5 min |
| Álcool absoluto II | 5 min |

#### 10. Diafanização

|          |        |
|----------|--------|
| Xilol I  | 20 min |
| Xilol II | 20 min |

#### 11 . Montar

*Resultado:* Melanina cora em negro

Lipofuscina cora em amarelo acastanhado

Hemossiderina cora em azul esverdeado

### 2.2 - Histoquímica de von Kossa

Fixador: Bouin ou Formol 10%

#### a) Solução de NITRATO DE PRATA 5%

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Nitrato de Prata..... | 5 g    |
| Água destilada.....   | 100 ml |

#### b) Solução TIOSULFATO DE SÓDIO 5%

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| Tiosulfato de Sódio..... | 5 g    |
| Água destilada.....      | 100 ml |

Procedimento:

#### 1. Desparafinar

|          |        |
|----------|--------|
| Xilol I  | 20 min |
| Xilol II | 20 min |

#### 2. Hidratar

|                    |       |
|--------------------|-------|
| Álcool absoluto I  | 5 min |
| Álcool absoluto II | 5 min |
| Álcool 90°         | 5 min |
| Álcool 80°         | 5 min |

Álcool 70°                      5 min

3. Passar por 3 vezes em água destilada
4. Gotejar sobre o corte na lâmina o Nitrato de Prata e submeta a luz solar por 30 minutos a 1 hora ou luz ultra violeta ou ainda a uma lâmpada de 100 watts
5. Enxaguar em água destilada
6. Passar em tiosulfato de Sódio 5% - 2 min
7. Lavar em água destilada por 3 vezes
8. Contra corar os núcleos péla Safranina por 5 minutos (Opcional)
9. Desidratar

    Álcool 70°                      5 min

    Álcool 80°                      5 min

    Álcool 90°                      5 min

    Álcool absoluto I            5 min

    Álcool absoluto II          5 min

10. Diafanização

    Xilol I    20 min

    Xilol II   20 min

- 11 . Montar

*Resultado:* Cálcio cora em negro