Débora Yamane Furquim Campos

Análise das respostas citogenotóxicas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto à água do mar diante da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", Ilha Rei George, Antártica

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Phan Van Ngan

São Paulo

2007

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Análise das respostas citogenotóxicas e histopatológicas do peixe *Trematomus newnesi* exposto à água do mar diante da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", Ilha Rei George, Antártica

Débora Yamane Furquim Campos

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/___/____

_____	_____
Prof. Dr. Phan Van Ngan	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito
_____	_____
Prof(a). Dr(a).	Conceito

Este trabalho é dedicado aos meus pais, José e Claudia, às minhas irmãs, Denise e Soraia e ao meu sobrinho Vinícius.

Sumário

Índice de Figuras.....i
Índice de Planilhas.....iv
Índice de Tabelas.....iv
Agradecimentos.....vi
Resumo.....ix
Abstract.....x
1 – Introdução.....1
2 – Objetivos.....7
3 – Área de estudo.....8
4 – Material e métodos.....10
4.1 – Organismo teste.....10
4.2 – Captura e manutenção.....10
4.3 – Métodos.....11
4.3.1 – Bioensaios para avaliação dos possíveis efeitos do despejo de esgoto e da contaminação por óleo combustível na água do mar diante da EACF sobre *T. newnesi*.....11
4.3.2 – Experimentos *in situ* para avaliação dos possíveis efeitos do despejo de esgoto e da contaminação por óleo combustível na água do mar em frente à EACF sobre *T. newnesi*, utilizando gaiolas.....12
4.3.3 – Ensaio de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias.....13
4.3.4 – Histopatologia de brânquias e fígado de *T. newnesi*.....14
4.3.4.1 – Histoquímica do fígado.....15
4.3.4.2 – Protocolo para avaliação da poluição aquática.....16
4.3.4.3 – Análise da densidade de macrófagos e de focos de células basofílicas.....20
4.3.4.4 – Ultra-estrutura do fígado.....20
4.4 – Análise Estatística.....22
5 – Resultados.....23
5.1 – Ensaio de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias.....23

5.2 – Histopatologia de brânquias e fígado de *T. newnesi*.....25
5.2.1 – Histopatologia das brânquias.....25
5.2.2 – Histopatologia do fígado.....28
5.2.2.1 – Histoquímica do fígado.....31
5.2.2.2 – Análise da densidade de macrófagos e de focos de células basofílicas.....33
5.2.2.3 – Ultra-estrutura do fígado.....35
5.2.3 – Índice total (Tot-I).....36
6 – Discussão.....38
7 – Conclusões.....52
8 – Bibliografia.....54
Figuras e tabelas.....64

Índice de Figuras

Figura 1. Localização da Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz” e dos locais de estudo, na Baía do Almirantado.....65

Figura 2. A. Vista aérea dos locais de estudo. **B.** Estação Antártica “Comandante Ferraz” (EACF). Tanques de armazenamento de combustível. **C.** EACF. Saída de esgoto, próxima ao heliponto.Terceira fase da Operação XXIII. Notar a pluma avançando para o mar.....65

Figura 3. *Trematomus newnesi*.....66

Figura 4. A. Laboratório úmido na EACF. A figura mostra a estrutura e os reservatórios utilizados para a realização dos bioensaios, nos quais os peixes foram expostos à água coletada diante dos tanques de combustível e da saída de esgoto, além dos peixes do grupo controle em água limpa. **B.** Gaiola utilizada nos experimentos *in situ*.....66

Figura 5. Esquema ilustrativo da região da cabeça de um peixe teleósteo. Duto de Cuvier. Local de obtenção do sangue para os esfregaços.....66

Figura 6. Eritrócitos maduros de *Trematomus newnesi*. **A.** Núcleo normal. **B.** Eritrócitos com micronúcleos. **C.** Núcleo reniforme. **D.** Núcleo lobado. **E.** Núcleo segmentado.....67

Figura 7. Medianas, valores máximos e mínimos das freqüências (‰) de ANE (Anormalidades nucleares eritrocitárias), Mn (Micronúcleo), L (Lobado), R (Reniforme) e S (Segmentado) no controle e em peixes expostos à água do mar coletada diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível, nos Bioensaios II (BII) e III (BIII), da Operação XXIII.....68

Figura 8. Medianas, valores máximos e mínimos das freqüências (‰) de ANE (Anormalidades nucleares eritrocitárias), Mn (Micronúcleo), L (Lobado), R (Reniforme) e S (Segmentado) no controle e em peixes expostos à água do mar coletada diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível, nos Bioensaios IV (BIV) e V (BV), da Operação XXIII.....69

Figura 9. Medianas, valores máximos e mínimos das freqüências (‰) de ANE (Anormalidades nucleares eritrocitárias), Mn (Micronúcleo), L (Lobado), R (Reniforme) e S (Segmentado) no controle e em peixes expostos à água do mar diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível, no Bioensaio VI (BVI) e nos experimentos Gaiola III (GIII) e IV (GIV), da Operação XXIV.....70

Figura 10. Figura 10. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola I da Operação XXII.....71

Figura 11. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio III da Operação XXIII.....71

Figura 12. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio IV da Operação XXIII.....72

Figura 13. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio V da Operação XXIII.....72

Figura 14. *T. newnesi,* lamelas branquiais, Gaiola III. **A e B.** Grupo controle. **A.** Lamelas secundárias em evidente processo de necrose. **B.** Hipertrofia das células epiteliais da lamela secundária. **C.** Grupo Esgoto. Observar a fusão das extremidades das lamelas secundárias. **D.** Grupo Tanque. Descamação do epitélio das lamelas secundárias. Azul de toluidina + fucsina básica.....73

Figura 15. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola III da Operação XXIV.....74

Figura 16. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio VI da Operação XXIV.....74

Figura 17. *T. newnesi,* lamelas branquiais, Bioensaio VI. **A.** Grupo controle. Estão presentes lamelas sem alterações. **B.** Grupo Esgoto. Observa-se a hiperplasia das células interlamelares na lamela primária, bem como a telangiectasia na extremidade das lamelas secundárias. **C.** Grupo Tanque. Telangiectasia lamelar. Notam-se os eritrócitos no interior dos vasos. Azul de toluidina + fucsina básica.....75

Figura 18. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola I da Operação XXII.....76

Figura 19. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola II da Operação XXII.....76

Figura 20. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio I da Operação XXII.....76

Figura 21. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio III da Operação XXIII.....77

Figura 22. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola III da Operação XXIV.....77

Figura 23. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio VI da Operação XXIV.....77

Figura 24. *T. newnesi,* fígado, Gaiola III. **A e B.** Grupo controle. **A.** Nota-se grande quantidade de macrófagos dispersos, além de numerosas inclusões lipídicas nas células parenquimais. **B.** Foco de necrose no órgão. **C.** Grupo Esgoto. Detalhe dos macrófagos no interior do órgão, com grandes vesículas digestivas. **D.** Grupo Tanque. Células basofílicas em pequenos agrupamentos no parênquima hepático. Azul de toluidina + fucsina básica.....78

Figura 25. *T. newnesi*, fígado, Bioensaio VI. **A.** Grupo controle. Nestes animais, o parênquima mostrou-se preservado. **B.** Grupo Esgoto. Parênquima hepático com grande ocorrência de inclusões lipídicas. **C.** Grupo Tanque. Presença de inclusões lipídicas de menor volume e em menor quantidade que na figura anterior. Azul de toluidina + fucsina básica.....79

Figura 26. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do glicogênio dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos Gaiola I (GI) e Gaiola II (GII), da Operação XXII e Gaiola III (GIII), da Operação XXIV.....80

Figura 27. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do glicogênio dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio I (BI), da Operação XXII, Bioensaio III (BIII), da Operação XXIII e Bioensaio VI (BVI), da Operação XXIV.....80

Figura 28. Número de macrófagos (n Ma) no fígado de peixes, *T. newnesi,* no controle e em indivíduos expostos a água do mar diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível nos experimentos Gaiola I (GI) e II (GII) e no Bioensaio I (BI) da Operação XXII e no experimento Gaiola III (GIII) da Operação XXIV.....81

Figura 29. Número de células basofílicas (n CB) no fígado de peixes, *T. newnesi,* no controle e em indivíduos expostos à água do mar diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível nos experimentos *in situ* **(G)** GI e GII, da Operação XXII e GIII da Operação XXIV e nos bioensaios **(B)** BI, BIII e BVI, das Operações XXII, XXIII e XXIV, respectivamente.....82

Figura 30. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET). *T. newnesi,* fígado, Gaiola III. **A até D.** Grupo controle. **A.** Hepatócito com estrutura citoplasmática perinuclear alterada. N = núcleo, nu = nucléolo. Barra = 2,02 µm. **B.** Macrófago intra-hepático. Detalhe de figuras de mielina em vesícula digestiva. Barra = 314,74 nm. **C.** Hepatócito. Detalhe de célula com ultra-estrutura nuclear e perinuclear normal, mas pode-se observar área citoplasmática à direita da figura com morfologia alterada. Barra = 1,72 µm. **D.** Macrófago intra-hepático.

Presença de inclusões citoplasmáticas em vários níveis de eletrondensidade. Barra = 1,71 µm. **E.** Grupo Esgoto. h = hepatócito. Ce = célula eletrondensa. Notar a presença de regiões vacuolares no seu interior. Barra = 3,3 µm **F.** Grupo Tanque. I = inclusões de variada eletrondensidade no citoplasma do hepatócito. Barra = 1,23 µm.....83

Figura 31. A. M.E.T. *T. newnesi*, fígado, Bioensaio VI. **A.** Controle. Hepatócito normal (h). mi = mitocôndria, N = núcleo, nu = nucléolo. Barra = 901,71 nm. **B.** Esgoto. N = núcleo, nu = nucléolo, h = hepatócito, Ce = célula eletrondensa. Barra = 3,93 µm. **C.** Tanque. N = núcleo, I = inclusões de variada eletrondensidade no citoplasma do hepatócito. Barra = 2,02 µm.....84

Figura 32. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* (**G**) GI, da Operação XXII, e GIII, da Operação XXIV. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos bioensaios (**B**) BIII, da Operação XXIII e BVI, da Operação XXIV.....85

Índice de planilhas

Planilha 1. Alterações branquiais observadas em peixes da espécie *Trematomus newnesi* expostos à água coletada diante da saída de esgoto, dos tanques de armazenamento de combustíveis e controle em água limpa.....86

Planilha 2. Alterações hepáticas observadas em peixes da espécie *Trematomus newnesi* expostos à água coletada diante da saída de esgoto, dos tanques de armazenamento de combustíveis e controle em água limpa.....86

Índice de Tabelas

Tabela 1. Comparação das freqüências de ANE, Mn, L, R e S dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos bioensaios realizados nas Operações XXIII (BII a BV) e XXIV (BVI).....87

Tabela 2. Comparação das freqüências de ANE, Mn, L, R e S dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos experimentos *in situ* realizados na Operação XXIV.....88

Tabela 3. Alterações histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* dos grupos controle e dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e da frente dos tanques de combustível.....89

Tabela 4. Alterações histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* dos grupos controle e dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e da frente dos tanques de combustível.....90

Tabela 5. Alterações histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* dos grupos controle e dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e da frente dos tanques de combustível.....91

Tabela 6. Comparação interanual dos Índices da brânquia dos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI) e XXIV (GIII).....92

Tabela 7. Comparação interanual dos Índices da brânquia dos bioensaios realizados nas Operações XXIII (BIII a BV) e XXIV (BVI).....92

Tabela 8. Comparação interanual dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI e GII) e XXIV (GIII).....93

Tabela 9. Comparação interanual dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos bioensaios realizados nas Operações XXII (BI), XIII (BIII) e XXIV (BVI).....93

Tabela 10. Comparação interanual da quantidade de macrófagos dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* das Operações XXII (GI e GII) e XXIV (GIII).....94

Tabela 11. Comparação interanual da quantidade de células basófilas dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos bioensaios realizados nas Operações XXII (BI), XXIII (BIII) e XXIV (BVI).....95

Tabela 12. Comparação interanual da quantidade de células basófilas dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI e GII) e XXIV (GIII).....96

Tabela 13. Comparação interanual dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI) e XXIV (GIII).....97

Tabela 14. Comparação interanual dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos bioensaios realizados nas Operações XXIII (BIII) e XXIV (BVI).....97

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Phan Van Ngan, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo exemplo de pessoa, pelo carisma, pela amizade e por ter me dado a oportunidade de ir à Antártica.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Instituto Oceanográfico da USP, pela disponibilização da infra-estrutura e a todos os docentes que tive a oportunidade de conviver, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao CNPq, ao MMA e à SECIRM, pelos apoios financeiros e logísticos, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vicente Gomes, pelos ensinamentos, pela orietação, pelo convívio, pela amizade, pela simpatia e pela companhia na Antártica.

À Profa. Dra. Maria Inês Borella, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela disponibilização de seu laboratório, pelos cafezinhos, pela simpatia e amizade. Ao Prof. Dr. Renato L. Barbieri, pelo auxílio, pela amizade e pelos ensinamentos.

À Zezé, Divaldo, Edinho e Luisinho, pelos auxílios, pela amizade, por estarem sempre dispostos a ajudar e especialmente aos “meninos”, por me ajudarem na manutenção da Câmara Fria.

Aos técnicos do ICB: Cruz Alberto Mendoza Rigonati, Gaspar e Gerson, pela colaboração, pelos ensinamentos e especialmente ao Cruz, pela paciência e amizade.

Ao pessoal do Laboratório de Ecofisiologia de Animais Marinhos do IOUSP de hoje: Arthur, Fábio G, Fábio M, Natali, Hermínio,Thaís Ribas, Kate e Maysa. Um obrigada muito especial para Thaís e Keyi, pela amizade, pelos conselhos e pela ajuda em vários momentos.

Ao pessoal do laboratório de ontem: Carol, Bruna, Felipe, Rosária, Cássia, Tita, Vivyane, Lucas, Fernando, Fernanda e Roberta.

Ao pessoal do IO: Paula, Adriana, Juliana, Sandrinha, Caia, Natália, Cíntia, Daniela, Lílian, Adriana Rachel, Newton, Cássia, Zé Edu, Caio Augusto, Gabriela, Sandra Motikawa e Juan, pela amizade, pelas conversas, pelos almoços na copinha, pelos encontros no corredor e pela convivência.

Ao Valter, Iberê e Nilson, por sempre resolverem os problemas de informática e especialmente ao Iberê, por ter ressuscitado meu pen drive.

Às secretárias do DOB, Dona Cida, Marlene, Miriam e às secretárias da pós-graduação, Ana Paula e Silvana, pela ajuda nos assuntos acadêmicos.

Aos funcionários da biblioteca do IO, por todos os auxílios.

Ao pessoal do grupo base da Operação Antártica XXIII: Luizandro, da Cruz, Luciana (doquinha), Senna, Ednei, Marquinho, Luís Carlos, Bafica, Moacir, Cabral e Renato e ao pessoal que participou da segunda fase desta expedição: Fifi, Vic, Cris Gallego, Alcides, Louise, Kátia, João Maluf, Adriana, Paty, Henrique, Juliana, Gilvan, Edgar, Fernando, Carol, Braz, Ana Paula, Cesarina, Erli, Nicolas, Júlio, Leandro, Xoiu, todo o pessoal do Arsenal da Marinha do Rio de Janeiro e especialmente ao Comandante Mesquita, Bafica e Cristina Engel, por terem sido meus cupidos antárticos.

Ao pessoal do grupo base da Operação Antártica XXIV: Bastos, Camarinha, Nestor, Robson, Cícero, Roberto, Cândido, Don Falcone, Rezende, Orlando, Carlão e ao pessoal que participou da segunda fase desta expedição: Almirante José Eduardo, Washington, Vic, Cris Engel, Cris Nakayama, Ema, Christiano, Henrique, Globy, Renata, Carlos, Rosa, Caio Cypro, Gilvan, HB, Setzer, Sandrinha, Mikolai, Bozoka, Julião, Kersia, Júlio, Leandro, Xoiu, Comandante Freitas e todo o pessoal do AMRJ.

A todos os meus avós, tias, tios, primas e primos, por terem participado de vários momentos da minha vida. Hoje, apesar da distância, sempre lembro

de cada um, principalmente dos que estão mais longe: Renata, Rafael e Rodrigo.

Ao Ricardo Xoiu, por tornar minha passagem pela Antártica ainda mais inesquecível, por ser uma pessoa muito especial para mim, pelo companheirismo, dedicação e incentivo, pelas pescarias (apesar das broncas!), pelo ombro amigo nas horas de necessidade e pelos conselhos.

Às minhas irmãs, Denise e Soraia, minhas grandes amigas, por todo o amor, amizade e companheirismo. Por sempre estarem do meu lado, me apoiarem e simplesmente por serem minhas irmãs. Ao meu sobrinho Vinícius, por ter trazido luz e alegria para nossa família, pelas risadas, pelo carinho e por você ser essa figurinha incrível.

Aos meus pais, por aceitarem, respeitarem, apoiarem e acreditarem no meu trabalho. Por sempre terem me oferecido condições para que eu pudesse estudar e me tornar a pessoa que hoje sou. Por terem sido meus grandes exemplos e por tudo o que vocês representam para mim. Acho que tudo o que eu escrever aqui vai ser pouco para agradecer tudo o que vocês fizeram e ainda fazem por mim.

A todos os que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho deixo aqui registrado os meus sinceros agradecimentos!!!

Resumo

A Antártica é um dos últimos lugares da Terra que ainda não sofreu grandes impactos antrópicos, embora muitos países tenham instalado estações de pesquisa na região. Apesar de limitadas, todas as atividades desenvolvidas nas estações dependem de combustíveis fósseis para geração de energia. Hidrocarbonetos de petróleo já foram detectados no solo e na água nas proximidades de diversas estações de pesquisa. Outra fonte potencial de poluição, na Antártica, são os esgotos lançados no mar pelas estações. Peixes da espécie *Trematomus newnesi* foram utilizados para investigar o potencial genotóxico e os efeitos sobre a morfologia de fígado e brânquias da água do mar diante dos tanques de combustível e da saída de esgoto da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", em experimentos *in situ* e no laboratório. O Ensaio de Micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos expostos e o grupo controle, em nenhum dos experimentos. Entretanto, observou-se que a freqüência de R foi, de maneira geral, menor nos controles do que nos grupos expostos tanto nos bioensaios como nos experimentos *in situ*. As lesões branquiais mais observadas, nos grupos expostos, foram a hipertrofia do epitélio e telangiectasia lamelar. No fígado, as lesões predominantes foram a vacuolização lipídica e a presença de macrófagos, principalmente nos peixes dos experimentos *in situ.* Estas alterações foram também observadas nos controles, porém com menor intensidade, em alguns casos. Foi realizada a análise semiquantitativa das lesões histopatológicas observadas nas brânquias e no fígado dos peixes, porém os grupos expostos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas dos Índices da brânquia e do fígado em relação aos controles. Contudo, os resultados obtidos sugerem que dos dois locais analisados nas proximidades da Estação Brasileira, a saída de esgoto apresenta maior potencial de risco para *T. newnesi*.

Palavras-chave: Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz", *Trematomus newnesi*, micronúcleo, histopatologia.

Abstract

Antarctica is one of the last places of the world upon which human activities have had minimal direct impact, even though many countries have installed research stations in the region. All the stations' activities require energy supplied by fossil fuels. Petroleum hydrocarbons had already been detected in the soil and water nearby many research stations. Another potential source of pollution in Antarctica is the sewage disposed into the sea by the stations. *Trematomus newnesi* specimens were used to assess genotoxic potential and histopathology of the liver and gills of the water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz". Fish were exposed to seawater at the sewage outfall and in front of the fuel tanks, in both *in situ* and laboratory assays. There were no statistically significative differences in the frequencies of micronucleus and other erythrocytic nuclear abnormalities between the exposed groups and the control in any of the experiments. However, it was observed that the frequency of R was, in general, lower in the control groups than in the exposed ones in both *in situ* and laboratory assays. The most frequent branchial lesions observed in the exposed groups were epithelium hipertrophy and lamelar telangiectasis. In the liver, predominant microscopic findings included lipid vacuolization and macrophages, specially in fish from the *in situ* experiments. These lesions were also observed in the control groups but with less intensity, in some experiments. The semiquantitative analysis of the branchial and hepatic histopathological lesions was performed. Exposed groups did not show branchial and hepatic indices significatively different from those of the controls. Nevertheless, our results suggest that of the places studied the sewage outlet may present a greater potential of risk to *T. newnesi* nearby the Brazilian Station.

Keywords: Brazilian Antarctic Research Station, *Trematomus newnesi*, micronucleus, histopathology.

1 – Introdução

Os oceanos cobrem aproximadamente 71% da superfície terrestre e abrigam uma grande variedade de organismos (Levinton, 1995). Desde os primórdios das civilizações, os oceanos são explorados por seus recursos. Do mar, os seres humanos retiram alimento, utilizam suas conchas e corais para artesanato, extraem seus minérios e petróleo para gerar energia. Entretanto, isto é apenas uma pequena parte do grande potencial oferecido pelos oceanos. Através dos mares, a humanidade se espalhou pelos cinco continentes e por fim, alcançou o sexto, o continente Antártico.

O crescimento populacional não afeta apenas os locais onde se localizam as cidades. Os resíduos produzidos pelas atividades humanas nem sempre recebem o devido tratamento e inevitavelmente atingem os corpos de água mais próximos, podendo ser descartados diretamente no mar ou em rios e córregos, que por fim deságuam no oceano. O maior volume de descarga, nos ambientes costeiros, é constituído por compostos orgânicos e suas principais fontes de deposição são os esgotos urbanos, os resíduos da agricultura, efluentes industriais e derramamentos de óleo (Clark, 1994). Uma vez lançados no ambiente, os poluentes podem ser transportados para outros locais através dos sistemas de correntes oceânicas, por transporte atmosférico (Weber & Montone, 1990), ou até mesmo pelos próprios animais, através dos comportamentos de migração e da cadeia alimentar.

A Antártica é uma das últimas áreas do mundo na qual as atividades humanas tiveram um impacto direto mínimo (Jiménez *et al*., 1999). Embora essas atividades sejam limitadas e ocorram principalmente nos meses de verão, todos os navios e embarcações menores, veículos terrestres e geradores de força das estações de pesquisa dependem de combustíveis fósseis como fonte de energia o ano todo. Portanto, toda estação costeira, na Antártica, é uma fonte potencial de hidrocarbonetos para o ambiente marinho (Cripps & Shears, 1997; Bícego *et al*., 1996).

Na Antártica, derramamentos acidentais de óleo ocorrem principalmente nas proximidades de estações científicas, devido ao armazenamento de combustível e reabastecimento de veículos motorizados e

aviões. Contaminações dessa natureza foram identificadas na Estação Americana “McMurdo” (Tumeo & Wolk, 1994), na Base Argentina “Marambio” (Pearce, 1994) e na Estação de Pesquisa Ucraniana “Vernadski” (antiga Estação Britânica “Faraday”) Nesta, após uma semana do derramamento, as concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), na água do mar, estavam abaixo do nível proposto por Cripps (1992) para o Oceano Antártico (76 ng/L), mas as de n-alcanos estavam consideravelmente mais altas do que o nível proposto (8,2 µg/L) (Cripps & Shears, 1997). Hidrocarbonetos de petróleo foram detectados no solo das proximidades da Estação Polonesa “H. Arctowski” (Krzyszowska, 1990) e na Estação Americana “Palmer”, na Península Antártica. Geralmente, as áreas contaminadas são bastante localizadas; entretanto, processos de drenagem podem transportar os poluentes para os sedimentos do sublitoral (Kennicutt II *et al*., 1992). O maior derramamento de óleo, no ambiente marinho, ocorreu nas proximidades da Estação “Palmer”, após o naufrágio do navio argentino “Bahia Paraiso”, em janeiro de 1989. Cerca de 6.10^5 litros de combustível foram derramados. A mancha de óleo espalhou-se por quase 100 km^2 e a contaminação afetou principalmente a zona entremarés. Este desastre causou o extermínio de centenas de aves e invertebrados marinhos da região (Kennicutt, 1990). Os HPAs são potencialmente carcinogênicos (Shailaja & D’Silva, 2003) e também podem induzir lesões hepáticas e desordens fisiológicas e bioquímicas em peixes (Oliveira-Ribeiro et al., 2005).

Além das contaminações por hidrocarbonetos, o despejo de esgoto também pode ser uma fonte potencial de poluição. Nas áreas civilizadas, os efluentes industriais e urbanos são responsáveis por altas concentrações de substâncias tóxicas no ambiente aquático, embora muitos países estejam começando a limitar descargas pontuais dessas substâncias nos mananciais (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Na Antártica, das quarenta e quatro estações científicas habitadas, a maioria despeja esgoto não tratado diretamente no mar (Hughes, 2004).

A Baía do Almirantado, onde se localiza a Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz” (EACF), é a maior baía da Ilha Rei George. A EACF foi inaugurada em fevereiro de 1984 e hoje é uma estação de pesquisa de tamanho médio, que abriga cerca de 50 pessoas no verão (Bícego *et al*., 1996)

e aproximadamente 15, no inverno. Suas principais fontes potenciais de impacto ambiental são os geradores de energia, incinerador de lixo, estação de tratamento de água e de esgoto, tanques de armazenamento de combustível, veículos motorizados e heliponto. Os resíduos sólidos produzidos na Estação são separados por categoria e, na medida do possível, incinerados ou armazenados e levados de volta para o Brasil. O esgoto e os líquidos domésticos passam por um sistema de tratamento antes de serem lançados ao mar. A água oriunda dos sanitários (água negra) é tratada separadamente da água oriunda de chuveiros e lavatórios (água cinzenta). O processo de tratamento da água negra consiste em uma fase primária seguida de uma fase secundária, que ocorre em filtros anaeróbios, e por fim segue em valas de filtração para o mar. A água cinzenta é encaminhada para uma caixa detentora de matéria sólida e depois para filtros anaeróbios, de onde segue, em valas de filtração diferentes das da água negra, também para o mar (SECIRM/PROANTAR, 2005).

Os peixes da Família Nototheniidae ocorrem nas altas latitudes do Hemisfério Sul e na região costeira da Antártica (Nelson, 1994). Alguns trabalhos anteriores de biomonitoramento obtiveram resultados satisfatórios com espécies do gênero *Trematomus* e mostraram que ela pode ser utilizada como indicadora de impacto de poluentes no ambiente antártico (Miller *et al*., 1999; Jiménez *et al*., 1999; Phan *et al.*, 2007).

A vantagem de utilizar peixes como bioindicadores é a facilidade com a qual os teleósteos, especialmente espécies de pequeno porte, podem ser manuseados e expostos a compostos químicos tóxicos, em laboratório. Os peixes respondem aos poluentes de maneira similar aos vertebrados superiores, portanto, eles podem ser utilizados para investigar compostos químicos que têm o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos (Al-Sabti & Metcalfe, 1995).

As respostas biológicas a contaminantes ambientais podem se manifestar em vários níveis de organização, desde o molecular, no qual a integridade genética e os processos subcelulares são avaliados, até o ecossistêmico, no qual a dinâmica e estrutura das cadeias alimentares podem ser afetadas. Estas respostas ao estresse provocado pelos poluentes podem

ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e são denominadas biomarcadores (Adams *et al.*, 1990).

Ao se estudar toxicidade aquática, vários testes podem ser realizados, sendo que os mais comuns avaliam a taxa de mortalidade e mudanças de comportamento durante exposições de curto prazo. Entretanto, essas medidas podem ser bastante insatisfatórias, por ignorarem informações potencialmente valiosas (Wester *et al.*, 2002). Biomarcadores biomoleculares/bioquímicos fornecem um tempo de resposta rápido, porém, sua limitação é a incerteza sobre a relevância biológica e toxicológica (Thomas, 1990). Por outro lado, a análise do crescimento e reprodução tem alta relevância biológica e ecológica, mas tem relativamente pouca sensibilidade ao estresse (Donaldson, 1990). Sendo assim, uma abordagem mais ampla incluindo diferentes biomarcadores pode oferecer um maior número de informações a respeito do real estado do organismo.

O ensaio de micronúcleo é uma técnica relativamente simples utilizada para detectar o efeito genotóxico de compostos químicos. Embora originalmente desenvolvido para aplicação em mamíferos, ele foi posteriormente modificado por Hooftman & de Raat (1982) para aplicação em peixes, no laboratório. Uma de suas vantagens é que ele pode ser aplicado a qualquer população de célula proliferativa e uma vez que os eritrócitos dos teleósteos são nucleados, estas células têm sido muito utilizadas como ferramenta para este ensaio. Além dos micronúcleos, alguns autores utilizam também outras anormalidades nucleares eritrocitárias para avaliar efeitos de exposição a poluentes. Em peixes, há vários tipos de lesões nucleares cuja origem ainda não foi compreendida. Essas anormalidades nucleares foram descritas e fotografadas por Carrasco e colaboradores (1990). Basicamente, elas foram classificadas como segmentadas, lobadas e reniformes, em adição ao micronúcleo típico. Recentemente, o ensaio de micronúcleo e de anormalidades nucleares eritrocitárias tem sido amplamente utilizado para investigar as propriedades genotóxicas de poluentes ambientais nestes organismos (Bombail *et al*., 2001; Pacheco & Santos, 1997; 2001; 2002), inclusive em peixes antárticos (Phan *et al.*, 2007).

Micronúcleos são formados, durante a divisão celular, pela condensação de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros que

não são incluídos no núcleo principal após a anáfase, por falta de centrômero. Vários estudos, utilizando sangue de peixes, mostraram uma alta incidência de micronúcleos após exposição a diferentes poluentes, no campo e no laboratório (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Alguns agentes mutagênicos-clastogênicos induzem a formação de micronúcleos nos peixes, como benzo[a]pireno, mitomycin C, DDTs e PCBs, mercúrio e outros (Metcalfe, 1988; Carrasco *et al.*, 1990; Willians & Metcalfe, 1992; Al-Sabti, 1994).

Os estudos histopatológicos também merecem destaque, uma vez que ajudam a identificar órgãos alvos da toxicidade e os mecanismos de ação. Além disso, os efeitos em níveis histológicos são visíveis após exposição a baixas concentrações de substâncias tóxicas em comparação a outras medidas de toxicidade tais como mortalidade e mudanças comportamentais (Wester *et al.*, 2002). Fortes indicações de uma relação entre poluição aquática e doenças/histopatologias de peixes foram relatadas por diversos autores (Arellano *et al.*, 2001; Ortiz-Delgado *et al.*, 2002).

Biomarcadores histopatológicos de exposição a xenobióticos têm sido amplamente reconhecidos como ferramentas valiosas para detecção de efeitos crônicos adversos nos organismos marinhos, após exposição a contaminantes (Myers *et al.*, 1998), incluindo exposição a HPAs (Pietrapiana *et al.*, 2002). A histopatologia representa uma resposta de nível superior, refletindo alterações prévias nas funções fisiológicas e/ou bioquímicas (Hinton *et al.*, 1992). Tecidos como brânquias e fígado são freqüentemente utilizados em tais análises (Arellano *et al.*, 2001; Rosety-Rodríguez *et al.*, 2002). As brânquias são responsáveis por funções vitais como respiração, osmorregulação e excreção. O contato permanente com o ambiente aquático e sua grande área de superfície são as principais razões que tornam as brânquias dos peixes um órgão-alvo da poluição. Geralmente, devido a essas características, é o primeiro órgão a reagir a condições ambientais desfavoráveis (Poleksić & Mitrović-Tutundžić, 1994).

O fígado dos teleósteos é um órgão relativamente grande e possui tanto funções endócrinas como exócrinas, além de realizar conversões metabólicas (Van Dyk, 2003). Algumas das principais funções do fígado são: a síntese e secreção de proteínas, a produção e secreção da bile, o metabolismo e a desintoxicação de drogas lipofílicas, a síntese e secreção de lipoproteínas e

a produção de uréia, a partir de íons de amônio. Segundo Stehr e colaboradores (2003), diversos estudos demonstraram uma associação entre lesões hepáticas e exposição a contaminantes químicos. Muitas substâncias não apresentam toxicidade na sua forma original; entretanto, após serem metabolizadas, no fígado, transformam-se em subprodutos altamente tóxicos. Dessa forma, o fígado pode sofrer sérias alterações morfológicas em decorrência da exposição do peixe a algum xenobiótico (Fanta *et al.,* 2003). Em função da demanda, formas de quantificar as respostas histopatológicas a fim de determinar o valor da severidade assim como da freqüência na resposta de um biomarcador, foram desenvolvidas (Bernet *et al.*, 1999). Invariavelmente, peixes de qualquer local poderão apresentar algum tipo de alteração, portanto, se a quantificação da severidade puder indicar a presença de condições mais estressantes nos locais contaminados, essa ferramenta será extremamente útil (Teh *et al.*, 1997).

A realização deste trabalho foi possível por meio do desenvolvimento do subprojeto “Rede 2 – Monitoramento de impacto ambiental, na Baía do Almirantado, através de biomarcadores”, no âmbito do projeto “Rede 2 – Gerenciamento ambiental na Baía do Almirantado, Ilha rei George, Antártica”, cujo objetivo foi fazer o monitoramento do impacto da presença humana na região.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo verificar os possíveis efeitos de xenobióticos provenientes das fontes potenciais de contaminação da Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz” (EACF), sobre peixes da espécie *Trematomus newnesi*, utilizando biomarcadores.

2.2 – Objetivos específicos

- Verificar a genotoxicidade da água do mar principalmente diante da saída do esgoto e em frente aos tanques de armazenamento de combustível da EACF, por meio do Ensaio de Micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias.
- Análise histopatológica de amostras de fígado e brânquias, visando identificar alterações provocadas por xenobióticos no meio aquático marinho, nas proximidades da EACF, principalmente diante da saída do esgoto e em frente aos tanques de armazenamento de combustível.

3 – Área de estudo

A Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz” (62º05’0”S, 58º23’28”W) está instalada na Península Keller, às margens da Enseada Martel, localizada na Baía do Almirantado, Ilha Rei George (Figura 1). A Ilha Rei George é a maior ilha do arquipélago Shetlands do Sul, que está localizado no lado ocidental da Península Antártica. A Baía do Almirantado foi designada como uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (AAEG), isto é, uma área de proteção histórica e ambiental que abrange inclusive o meio marinho. É uma área de interesse, pois apresenta grande variabilidade ao longo do ano, principalmente da cobertura de gelo marinho e terrestre e das condições climáticas, refletindo nas condições de todo o ecossistema.

As águas da Baía atingem profundidades variáveis, que vão desde áreas rasas até locais que ultrapassam os 500 metros. A temperatura atmosférica média anual, da região, é de –2,8 ºC, sendo que no verão a média é de 0,9 ºC e no inverno, -7 ºC (Ferron *et al.*, 2004 *apud* Weber & Montone, 2006). O aquecimento atmosférico também tem afetado a Ilha Rei George e, no período compreendido entre 1947 e 1995, a média de incremento na temperatura foi de 1,1 ºC, o que tem contribuído para a retração das geleiras (Arigony, 2001 *apud* Weber & Montone, 2006). A hidrografia da Baía é bastante complexa, principalmente no verão, pois ocorrem dois influxos de água para o seu interior. Um é proveniente do Estreito de Bransfield, trazendo água salgada, e o outro introduz água doce, por meio dos processos de degelo. Segundo Szafránzaki & Lipski (1982), a camada superficial, até cerca de 35 metros de profundidade, é uma mistura da água do mar com a água de degelo, com salinidade variando de 16 a 34 e temperaturas entre -1,6 a 3 ºC.

A EACF dispõe de variadas fontes de contaminação ambiental. O esgoto vem sendo lançado no mar desde a inauguração da Estação em 1984, embora uma estação de tratamento tenha sido instalada em 1995/96. Vazamentos acidentais de combustível (diesel) e as atividades de abastecimento de equipamentos motorizados podem introduzir, no ambiente, substâncias derivadas do petróleo, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, muitos dos quais são considerados mutagênicos e carcinogênicos (De Flora *et al.*, 1991; Al-Sabti & Metcalfe, 1995; Ohe *et al.*, 2004). Para este

estudo, portanto, foram selecionados três locais para a realização dos experimentos: um diante da saída do esgoto, outro diante dos tanques de armazenamento de combustíveis e um local considerado livre de poluição, nas proximidades de Punta Plaza (Figura 2).

4 – Material e Métodos

4.1 – Organismo teste

Os peixes da espécie *Trematomus newnesi* Boulenger, 1902 (Figura 3) pertencem à Família Nototheniidae. Ocorrem na costa oeste da Península Antártica, nas costas do Continente Antártico e nas ilhas Shetland do Sul e Orkney do Sul, apresentando uma distribuição circumpolar. Podem ser encontrados da zona entremarés, onde são bastante abundantes, até 160 m de profundidade. A desova acontece em setembro, próximo à costa. Esta espécie alimenta-se de eufausiáceos, copépodes, anfípodas e poliquetas. Não é explorado comercialmente, mas é um item importante na dieta de muitas aves marinhas antárticas (Hureau, 1985).

Neste estudo, espécimes com 84,19 ± 21,13 mm de comprimento e 7,27 ± 5,82 g de massa corpórea foram utilizados para a realização dos experimentos. O sexo não foi considerado, uma vez que os peixes eram imaturos.

4.2 – Captura e manutenção

As capturas ocorreram durante as Operações Antárticas XXII (2003/2004), XXIII (2004/2005) e XXIV (2005/2006), na segunda e terceira fases de verão, que correspondem aos períodos de dezembro/janeiro e janeiro/fevereiro, respectivamente.

Os indivíduos de *T. newnesi* foram capturados com uma pequena rede de arrasto de fundo, especialmente desenhada por nossa equipe para operar a bordo de um bote inflável com motor de popa, modelo Zodiac. Arrastos de dez minutos cada, para evitar possíveis danos físicos aos animais capturados, foram realizados paralelamente à linha de costa, a uma profundidade de 10 metros, em locais de ocorrência de bancos de algas, onde os peixes eram mais facilmente encontrados. As capturas ocorreram principalmente diante do Módulo de Química, em Punta Ullman e no lado oposto da enseada. Após o arrasto, a rede era recolhida e os organismos capturados passaram por triagem e foram acondicionados em uma caixa de marfinite contendo água do mar. Os

períodos de captura tiveram a duração máxima de duas horas, para evitar não apenas o aumento da temperatura da água, apesar de sua troca constante, mas também uma maior intensidade de estresse aos peixes. Os peixes capturados foram conduzidos à EACF e acondicionados em tanques contendo água do mar filtrada, localizados em um laboratório úmido com temperatura mantida a 0 ºC ± 1 ºC. Os animais foram alimentados com pequenos anfípodas uma vez ao dia e a água dos tanques foi renovada diariamente. Os exemplares foram mantidos por um período mínimo de sete dias antes da realização dos experimentos, nos tanques do laboratório úmido, para aclimatação às condições de cativeiro.

4.3 – Métodos

4.3.1 – Bioensaios para avaliação dos possíveis efeitos do despejo de esgoto e da contaminação por óleo combustível na água do mar diante da EACF sobre *T. newnesi*

Após o período de aclimatação, foram realizados bioensaios, em laboratório, nos quais os peixes foram expostos à água do mar coletada em frente à saída do esgoto e diante dos tanques de armazenamento de combustível. A água coletada em pontos afastados da estação e que foram considerados locais livres de contaminação foi utilizada como controle.

Os animais foram colocados em três reservatórios de 20 litros, contendo a água das regiões mencionadas, com três a cinco peixes em cada grupo (Figura 4A).

Na Operação XXII, foi realizado um bioensaio (Bioensaio I, n = 9), na terceira fase (janeiro/fevereiro). Na Operação XXIII, foram realizados dois bioensaios (Bioensaios II, n = 15, e III, n = 12) na segunda fase (dezembro/janeiro) e outros dois (Bioensaios IV, n = 9, e V, n = 9), na terceira (janeiro/fevereiro). Devido às más condições climáticas, a água do mar coletada por uma bomba submersa, a qual abastece os laboratórios úmidos da Estação, foi armazenada em tanques, filtrada com filtro Cuno de 1 µm, armazenada por mais 3 a 5 dias com aeração e utilizada para manter o grupo

controle. Na Operação XXIV, o grupo controle foi mantido com água do mar coletada durante as saídas de bote ou da embarcação Skua em locais distantes da Estação e mais afastados da praia. Somente um bioensaio foi realizado durante esta Operação (Bioensaio VI, n = 9), na segunda fase (dezembro/janeiro).

Cada um dos bioensaios foi conduzido no laboratório úmido por sete dias. Diariamente, era realizada a troca da água dos reservatórios utilizando a água dos respectivos locais de coleta e eram fornecidos pequenos anfípodas como alimentação, a qual foi interrompida 24 horas antes da coleta do material biológico. Houve mortalidade ao final de apenas um dos bioensaios, um indivíduo do grupo Tanque do Bioensaio IV.

4.3.2 – Experimentos *in situ* para avaliação dos possíveis efeitos do despejo de esgoto e da contaminação por óleo combustível na água do mar em frente à EACF sobre *T. newnesi*, utilizando gaiolas

Os peixes, após aclimatação em laboratório, foram acondicionados em gaiolas de ferro (50X50x15 cm) revestidas com panagem de 0,5 cm de nó a nó (Figura 4B). Estas gaiolas foram colocadas no mesmo local de onde foram coletadas as águas utilizadas nos bioensaios: em frente à saída do esgoto e em frente aos tanques de armazenamento de combustível, a uma profundidade suficiente para que permanecessem submersas na maré baixa. Uma gaiola foi colocada num local entre a Estação e Punta Plaza (Figura 1 e 2A), considerado livre de contaminação, para servir de controle. Na Operação XXII, foram realizados dois experimentos, um na segunda (Gaiola I, n = 9) e outro na terceira fase (Gaiola II, n = 9) e na Operação XXIV, também foi realizado um experimento na segunda (Gaiola III, n = 15) e outro na terceira fase (Gaiola IV, n = 15). Na Operação XXIII, devido às más condições climáticas, não foi possível realizar os experimentos com gaiolas. Foram colocados de três a cinco peixes em cada gaiola e após 12 dias de exposição, estas foram resgatadas para a retirada dos animais e coleta do material biológico. Houve mortalidade ao final dos experimentos Gaiola I (um peixe do controle e outro do grupo Tanque), Gaiola II (um peixe do controle) e Gaiola III (três peixes do controle).

4.3.3 – Ensaio de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias

Esta metodologia foi realizada durante a Operação XXIII (Bioensaios II a V) e Operação XXIV (Bioensaio VI, Gaiolas III e IV).

Após o período de exposição, o sangue foi retirado do duto de Cuvier (Figura 5) com uma seringa de insulina e espalhado sobre uma lâmina de vidro limpa, com o auxílio de uma lamínula, para obtenção de esfregaços sangüíneos. Estes foram fixados em metanol absoluto por 10 minutos e secos ao ar. As lâminas, trazidas para São Paulo, foram coradas com Giemsa 10% por 40 minutos, codificadas, analisadas aleatoriamente e documentadas sob fotomicroscópio, com um aumento de 1000x. As informações sobre a morfologia nuclear foram identificadas de acordo com Carrasco e colaboradores (1990), modificado por Pacheco & Santos (1997). A que dá nome à técnica, Micronúcleo (Mn), apresenta-se como um pequeno corpo não-refringente, de cor e forma semelhante ao do núcleo principal, porém com diâmetro entre 1/16 e 1/3 do mesmo. As outras anormalidades nucleares eritrocitárias (ANE) foram denominadas: Reniforme (R), que apresenta forma semelhante a um rim; Lobado (L), no qual o núcleo é dividido em lobos e Segmentado (S), que apresenta o núcleo separado por uma constrição, em partes não necessariamente do mesmo tamanho (Figura 6). Foram examinados 2000 eritrócitos em cada lâmina e os dados obtidos foram utilizados para calcular a freqüência (‰) de micronúcleos e de anormalidades nucleares encontradas, conforme as fórmulas:

Freqüência de Mn = f(Mn) = Mn/2000
Freqüência de R = f(R) = K/2000
Freqüência de L = f(L) = L/2000
Freqüência de S = f(S) = S/2000
Freqüência de ANE = f(ANE) = (Mn+R+L+S)/2000

onde: Mn, R, L e S = número de micronúcleos, reniformes, lobados e segmentados encontrados em 2000 eritrócitos examinados.

Quando possível, duas lâminas de cada indivíduo foram analisadas, seguindo o mesmo protocolo descrito e, em seguida, obtida a média entre as duas.

4.3.4 – Histopatologia de brânquias e fígado de *T. newnesi*

A coleta de amostras para a análise histopatológica foi realizada nas três Operações Antártica em estudo. As amostras de fígado foram obtidas, na Operação XXII, do Bioensaio I e das Gaiolas I e II; na Operação XXIII, do Bioensaio II e na Operação XXIV, do Bioensaio VI e da Gaiola III. O fígado dos peixes utilizados nestes experimentos foi dividido para a realização de análises enzimáticas, além das análises histopatológicas. As análises enzimáticas necessitavam de amostras de fígado de pelo menos 1 g. Quando o fígado dos peixes era muito pequeno (máximo 1 g), este foi totalmente separado para as análises enzimáticas. Deste modo, um peixe do grupo Tanque dos experimentos Bioensaio I e Bioensaio III e um peixe do grupo Esgoto da Gaiola III tiveram o fígado separado apenas para análises enzimáticas. As amostras de brânquia foram obtidas, na Operação XXII, da Gaiola I; na Operação XXIII, dos Bioensaios III, IV e V e na Operação XXIV, do Bioensaio VI e da Gaiola III.

As amostras de fígados e brânquias foram coletadas e imediatamente fixadas em formalina 10% neutralizada em tampão fosfato 0,1 M, por 24 horas a 4 ºC. Após a fixação, o material foi transferido para álcool 70%, no qual ficou armazenado até o momento do processamento. No laboratório, em São Paulo, foram retirados os arcos branquiais, sob estereomicroscópio e com o auxílio de um micro-bisturi, a fim de separá-los das lamelas para facilitar a microtomia. Os fígados foram seccionados em amostras menores. O material passou por uma série alcoólica de concentrações crescentes até 95%, para desidratação e, em seguida, infiltrado com uma solução de historresina Leica® + etanol (1:1) por 4 horas, na geladeira. Posteriormente, o material foi transferido para historresina de infiltração, no qual permaneceu sob refrigeração até o momento do emblocamento em historresina + endurecedor, segundo o protocolo do fabricante. Secções de 2 µm de espessura foram obtidas no micrótomo Leica RM2155, do Laboratório de Endocrinologia de Peixes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da

Universidade de São Paulo (ICB/USP). Para evidenciar as características morfológicas na estrutura dos órgãos, as secções histológicas foram submetidas à reação histoquímica com Azul de Toluidina e Fucsina básica e montadas em Permount. Na seqüência, algumas lâminas foram analisadas e os campos mais significativos tiveram suas imagens capturadas em fotomicroscópio Zeiss Axioskop acoplado à câmera digitalizadora Pixera (proj. FAPESP 98/14693-6), no Laboratório de Endocrinologia de Peixes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB/USP.

4.3.4.1 – Histoquímica do fígado

Além da coloração com Azul de Toluidina e Fucsina básica, outras técnicas histoquímicas foram aplicadas para evidenciar particularidades no fígado dos animais utilizados nos experimentos.

a. Técnica do PAS (Ácido Periódico de Schiff)

Esta técnica foi utilizada com a finalidade de evidenciar a presença de depósitos de glicogênio no órgão e a presença de mucopolissacarídeos no interior dos macrófagos. O ácido periódico tem a capacidade de oxidar as ligações carbono-carbono dos grupamentos 1-2 glicol, dos hidratos de carbono, produzindo aldeídos. O reagente de Schiff, por sua vez, reage com os aldeídos, produzindo um composto insolúvel de cor magenta.

b. Método de Perls (Azul da Prússia)

Este método é utilizado para verificar a ocorrência de pigmentos férricos no tecido. Neste trabalho, foi empregado para evidenciar a presença de hemosiderina, proveniente da degradação de eritrócitos no interior dos macrófagos.

c. Hematoxilina de Harris-Eosina

A técnica da Hematoxilina-Eosina foi empregada, neste estudo, com a finalidade de evidenciar a presença do pigmento melanina no interior dos macrófagos. Este pigmento pode ser facilmente visualizado por esta técnica, que lhes confere coloração amarelo-amarronzada a marrom escuro.

d. Rosenfeld

Esta técnica foi utilizada para evidenciar a infiltração de leucócitos no parênquima hepático, característica de processo inflamatório. O método baseia-se na coloração diferencial dos leucócitos, permitindo sua identificação entre os demais tipos celulares presentes no tecido.

4.3.4.2 – Protocolo para avaliação da poluição aquática

Bernet e colaboradores (1999), preocupados com a falta de consenso nos métodos de avaliação de lesões histopatológicas em peixes, propuseram um método de avaliação padronizado. Segundo estes autores, o método é aplicável a qualquer órgão, fornece uma quantificação padronizada, permite uma legítima comparação entre estudos diferentes e, com restrições, entre órgãos diferentes também.

As alterações patológicas de cada órgão analisado são classificadas em cinco padrões de reação. Cada padrão inclui diversas alterações que consideram tanto as unidades funcionais do órgão como o órgão inteiro.

Padrão de reação 1 (pr 1): distúrbios circulatórios – resultam de uma condição patológica do fluxo de sangue e fluidos teciduais. Caracterizam-se por:

1- Hemorragia/hiperemia/aneurisma – extravasamento de sangue dos vasos (hemorragia), congestão de sangue no órgão (hiperemia) e dilatações bem-delineadas de artérias (aneurisma).

2- Edema intercelular – acúmulo excessivo de fluido tecidual extravasado do meio vascular.

Padrão de reação 2 (pr 2): alterações regressivas – levam a uma redução funcional ou perda de um órgão. Inclui as seguintes alterações:

1- Alterações na arquitetura e estrutura – alterações na estrutura do tecido assim como no formato e arranjo das células.

2- Alterações no plasma – presença de gotículas de vários materiais, vacuolização lipídica, degeneração hialina.

3- Depósitos – acúmulo de substâncias derivadas de processos degenerativos no interior das células.

4- Alterações nucleares – alterações no formato nuclear e na estrutura da cromatina.

5- Atrofia – redução no número e volume das células e/ou diminuição do volume extracelular.

6- Necrose – alteração irreversível causada pela morte celular. Geralmente é reconhecida pelas alterações no núcleo da célula: picnose (núcleo encolhido e muito escuro), cariorrese (ruptura da membrana nuclear) e cariólise (hidrólise dos ácidos nucléicos; em peixes, aparece como faixas de cromatina com formato irregular).

Padrão de reação 3 (pr 3): alterações progressivas – provocam o aumento da atividade celular ou do tecido. As lesões são:

1- Hipertrofia – aumento do volume celular ou do tecido.

2- Hiperplasia – aumento da densidade populacional celular.

Padrão de reação 4 (pr 4): inflamação – geralmente está associado à migração de leucócitos para o meio extravascular ou a outro padrão de reação, como por exemplo o edema. Portanto, apenas são consideradas as seguintes lesões:

1- Exsudato – fluido intersticial contendo uma alta concentração de proteínas e grande quantidade de restos celulares que extravasa dos vasos sangüíneos e linfáticos.

2- Ativação do sistema reticuloendotelial (SRE) – hipertrofia de células endoteliais e macrófagos que margeiam pequenos vasos sangüíneos.

3- Infiltração – invasão do tecido por leucócitos da circulação sangüínea.

Padrão de reação 5 (pr 5): tumor (neoplasma) – proliferação descontrolada de células e de tecido. Pode ser de dois tipos:

1- Benigno – células diferenciadas, porém parecidas com as normais, que substituem ou deslocam o tecido original.

2- Maligno – células pouco diferenciadas, de rápida multiplicação, que invadem e destroem os tecidos.

Para a avaliação histológica, são utilizados dois parâmetros. O primeiro é o **fator de importância (w)**. Ele define a relevância de uma lesão, isto é, o quanto ela afeta a função do órgão e a capacidade de sobrevivência do peixe. A cada alteração descrita nos padrões de reação é atribuído um fator:

1- importância patológica mínima. A lesão é facilmente reversível ao fim da exposição à substância tóxica.

2- importância patológica moderada. A lesão é reversível, na maioria dos casos, se a exposição for interrompida.

3- importância patológica acentuada. A lesão é geralmente irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão.

O segundo parâmetro é a **pontuação (a)**. A cada alteração é atribuído um valor, que varia de 0 a 6, dependendo do grau e extensão da lesão: (0) sem alteração, (1-2) ocorrência leve, (3-4) ocorrência moderada e (5-6) ocorrência severa.

Utilizando os fatores de importância e as pontuações, podem ser calculados quatro índices.

Quando apenas um órgão está sendo examinado, são aplicados os seguintes índices:

1 – Índice do órgão (I_{org}) – representa o grau de dano a um órgão. Um alto índice indica um alto grau de dano.

$$I_{org} = \sum_{pr} \sum_{alt} (a_{org\ pr\ alt} \times w_{org\ pr\ alt})$$

onde: org = órgão (constante); pr = padrão de reação; alt = alteração; a = pontuação; w = fator de importância.

2 – Índice de reação de um órgão ($I_{org\ pr}$) – indica a qualidade da lesão de um órgão. A soma dos cinco índices de reação de um órgão equivale ao índice do órgão (I_{org}).

$$I_{org\ pr} = \sum_{alt} (a_{org\ pr\ alt} \times w_{org\ pr\ alt})$$

onde: org, pr = constante, (para abreviações, ver fórmula do índice do órgão).

Se vários órgãos estiverem sendo estudados, mais dois índices podem ser calculados:

3 – Índice total (Tot-I) – representa uma medida geral do estado de saúde, baseado nas alterações histológicas.

$$\text{Tot-I} = \sum_{org} \sum_{pr} \sum_{alt} (a_{org\ pr\ alt} \times w_{org\ pr\ alt})$$

(para abreviações, ver fórmula do índice do órgão).

4 – Índice de reação total (I_{pr}) – indica a qualidade das lesões histológicas em todos os órgãos examinados de um único peixe.

$$I_{pr} = \sum_{org} \sum_{alt} (a_{org\ pr\ alt} \times w_{org\ pr\ alt})$$

onde: pr = constante, (para abreviações, ver fórmula do índice do órgão).

Baseado no trabalho de Bernet e colaboradores (1999), foi desenvolvido um quinto índice, o Índice do Glicogênio, para indicar a qualidade da reação histoquímica do PAS no fígado.

5 – Índice do glicogênio (I_{gli})

$$I_{gli} = a_{org\ pr\ alt} \times w_{org\ pr\ alt}$$

(para abreviações, ver fórmula do índice do órgão)

Após esta interpretação, foram desenvolvidas duas planilhas de trabalho a partir das quais procedeu-se a análise histopatológica das brânquias (Planilha 1) e do fígado (Planilha 2). Com a quantificação das lesões, foi possível aplicar uma análise estatística para comparar os índices.

4.3.4.3 – Análise da densidade de macrófagos e de focos de células basofílicas

Os macrófagos e as células basofílicas foram submetidos à análise de densidade com o auxílio de uma lente ocular reticulada, com 1 mm^2 de área total e 0,01 mm^2 de área em cada quadrado. Foram analisados 15 campos, escolhidos aleatoriamente, nas lâminas contendo amostras de fígado de todos os peixes utilizados para a análise histopatológica. A análise foi realizada sob aumento de 40x e o número de macrófagos e o de células basofílicas foi apresentado em número/mm^2.

4.3.4.4 – Ultra-estrutura do fígado

Parte do fígado dos indivíduos utilizados nos experimentos Gaiola III e Bioensaio VI, realizados na segunda fase da Operação XXIV, foi preparado para análise de sua ultra-estrutura. O material foi fixado em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, no qual foi mantido, sob refrigeração, até o momento do processamento, no Laboratório de Endocrinologia de Peixes do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). A inclusão do material seguiu o seguinte protocolo:

Primeira etapa

a. lavagem do material em tampão fosfato 0,1 M (3x de 5 min).
b. pós-fixação com tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato 0,2 M (1:1) por duas horas.
c. lavagem em água destilada (3x de 3 min).
d. banho em acetato de uranila (overnight).
e. lavagem em água destilada (3x de 5 min).
f. lavagem em álcool 70% (3x de 10 min).
g. lavagem em álcool 95% (3x de 10 min).
h. lavagem em álcool absoluto (4x de 15 min).
i. lavagem em óxido de propileno (2x de 15 min).
j. Infiltração em resina + óxido de propileno (1:1) por oito horas, em rotação lenta, em temperatura ambiente.

Segunda etapa

a. infiltração em resina por cinco horas, em rotação, em temperatura ambiente.
b. inclusão com disposição das amostras em moldes de silicone e acondicionamento em estufa a 60 ºC por três dias ou até polimerização.

Após a polimerização dos blocos, deu-se início à obtenção dos cortes finos, com 0,5 µm de espessura. Estas secções foram coradas com Azul de Toluidina e observadas em microscópio de luz para determinação dos locais a serem examinados no microscópio eletrônico de transmissão. Foram selecionados três exemplares de cada tratamento, de cada experimento, de acordo com as condições de preservação e qualidade do material, para representar as amostras. Em seguida, foram obtidos os cortes ultrafinos, de aproximadamente 70 nm de espessura, que foram montados em telas de ouro de 200 mesh e processados para o contraste (1 hora em acetato de uranila a 2% em água destilada, lavagem em água destilada por 30 minutos e, a seguir, em citrato de chumbo 0,5% em água destilada). A observação, a análise e a documentação do material foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol CX 100 do Departamento de Biologia Celular e do

Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

4.4 – Análise Estatística

Como já mencionado, alguns experimentos apresentaram mortalidade de indivíduos ao final do período de exposição ou tiveram que ter o material separado para outros tipos de análises, fazendo com que o número de indivíduos amostrados ficasse abaixo do limite para a realização de análises estatísticas. Nestes casos, foi calculada a média dos resultados obtidos em cada grupo experimental e a análise foi realizada por meio da comparação das médias. Entretanto, os gráficos dos resultados foram apresentados em medianas, pois o comportamento dos dados foi semelhante ao apresentado pelas médias. Para os experimentos com mais de três indivíduos por grupo a análise dos resultados foi realizada por meio de teste estatístico não-paramétrico. Apesar do número baixo, os experimentos com apenas dois indivíduos em pelo menos um dos grupos também foram analisados estatisticamente. Desta forma, as medianas dos resultados das freqüências de micronúcleos e das anormalidades nucleares eritrocitárias e os índices de lesões histopatológicas de fígado e brânquias foram comparadas utilizando o teste Kruskal-Wallis. Quando ocorreram, as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste *a posteriori* de Mann-Whitney (Statistica 5.0). Os resultados das contagens de macrófagos e de células basofílicas também foram comparados por Kruskal-Wallis e as diferenças entre os grupos foram determinadas pelo teste *a posteriori* de Dunn (BioEstat 3.0).

5 – Resultados

5.1 – Ensaio de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias

Os esfregaços sangüíneos de *T. newnesi* apresentaram eritrócitos em diferentes fases de maturação, podendo ser reconhecidos claramente eritrócitos jovens e maduros. Os eritrócitos jovens apresentaram-se com formato circular, núcleo central também circular e citoplasma corado em tom azulado pela técnica utilizada. Os eritrócitos maduros apresentaram formato elíptico, núcleo central ovalado e citoplasma corado de rosa pelo corante Giemsa. Leucócitos também foram observados nos esfregaços durante as análises, mas não foram utilizadas como parâmetro de avaliação de efeito de poluentes, neste estudo.

A contagem de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares eritrocitárias foi efetuada apenas nos eritrócitos maduros da circulação periférica. A presença dessas lesões nucleares foi verificada em todos os tratamentos, inclusive nos controles.

Os resultados dos bioensaios realizados na Operação XXIII podem ser observados nas figuras 7 e 8. Não houve diferença significativa na freqüência de ANE e dos outros parâmetros analisados (Mn, R, L e S) entre o controle e os grupos expostos à água coletada diante dos tanques de armazenamento de combustível e da saída de esgoto em nenhum dos quatro bioensaios realizados durante as duas fases de verão desta Operação. Os peixes expostos à água coletada diante dos tanques também não apresentaram freqüência de ANE e dos outros parâmetros significativamente diferente dos peixes expostos à água da saída de esgoto. Do ponto de vista descritivo, o grupo controle do Bioensaio II apresentou maior freqüência de Mn em relação aos grupos expostos. Isso pode ser atribuído ao fato de um indivíduo ter apresentado freqüência de Mn maior do que os outros indivíduos do grupo. O grupo Esgoto apresentou freqüência de R maior do que a dos grupos controle e Tanque e freqüência de Mn maior do que a do grupo Tanque. No Bioensaio III, a alta freqüência de ANE do grupo controle deveu-se a uma alta freqüência de R de um dos indivíduos do grupo. Apesar disso, foi possível notar que as freqüências de

ANE e dos outros parâmetros do grupo Tanque foram maiores do que as do grupo Esgoto, invertendo a situação do experimento anterior. No Bioensaio IV, os grupos Tanque e Esgoto apresentaram freqüências de todos os parâmetros maiores que as do grupo controle, principalmente do parâmetro R. A maior freqüência de ANE do grupo Tanque em relação ao grupo Esgoto pode ser devido a uma maior freqüência do parâmetro S, embora apenas dois indivíduos tenham sido amostrados no grupo Tanque, um a menos que no grupo Esgoto. No Bioensaio V, o grupo Esgoto apresentou freqüência de R maior do que a do controle e do grupo Tanque, porém isso provavelmente ocorreu devido a uma grande variação individual, na qual um dos exemplares do grupo apresentou alta freqüência de R. No parâmetro ANE, o grupo Esgoto também apresentou freqüência maior do que a do grupo Tanque, porém, muito próxima da do controle.

Na Operação XXIV não houve diferença significativa na freqüência de ANE e dos outros parâmetros entre o controle e os tratamentos, tanto no bioensaio como nos experimentos *in situ*. Os resultados desses experimentos podem ser observados na figura 9. No Bioensaio VI, os grupos expostos apresentaram freqüências de ANE e dos outros parâmetros maiores do que as do grupo controle, enquanto que o grupo Esgoto apresentou freqüência de ANE maior que a do grupo Tanque. Esta diferença deveu-se à variação individual, na qual as freqüências de L e R de um dos indivíduos do grupo foram maiores que as dos outros exemplares. Na Gaiola III, o grupo controle apresentou freqüência de ANE maior que a dos grupos expostos. Isso ocorreu principalmente devido ao pequeno número de indivíduos amostrados; apenas dois, enquanto que nos outros grupos foram amostrados cinco indivíduos de cada. Apesar disso, observou-se, neste experimento, que o grupo Esgoto apresentou freqüências de anormalidades nucleares maiores do que as do grupo Tanque. Na Gaiola IV, os grupos expostos apresentaram freqüências de anormalidades maiores do que as do grupo controle, embora as freqüências de todas as anormalidades nucleares deste grupo tenham sido bem próximas às dos grupos expostos. Novamente, o grupo Esgoto apresentou freqüência de anormalidades nucleares, principalmente do parâmetro R, maior do que os grupos controle e Tanque.

Comparando os resultados das freqüências de todos os parâmetros analisados entre os quatro bioensaios realizados na Operação XXIII, observou-se que entre os grupos controle não houve diferenças significativas. Entretanto, houve diferença significativa na freqüência de Mn dos grupos expostos à água coletada diante dos tanques de combustível entre os Bioensaios II e IV ($p < 0,05$), entre os Bioensaios II e V ($p < 0,05$) e entre os Bioensaios III e V ($p < 0,05$). A freqüência de Mn dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto também foi significativamente diferente entre os Bioensaios II e IV ($p < 0,05$) e entre os Bioensaios II e V ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Entre os experimentos *in situ*, da Operação XXIV, não houve diferenças significativas nas freqüências dos parâmetros analisados entre os grupos controles e nem entre os grupos expostos à água da saída de esgoto. Porém, nos grupos expostos à água coletada diante dos tanques, houve diferença significativa na freqüência de ANE ($p < 0,01$) e de R ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Fazendo uma comparação interanual entre os bioensaios da Operação XXIII e o bioensaio realizado na Operação XXIV, não foi observada diferença significativa na freqüência de nenhum dos parâmetros entre os grupos controle e nem entre os grupos expostos à água coletada diante dos tanques. Entretanto, nos grupos expostos à água da saída de esgoto, verificou-se uma diferença significativa na freqüência de Mn entre o Bioensaio V, da Operação XXIII e o Bioensaio VI, da Operação XXIV ($p < 0,05$) (Tabela 1).

5.2 – Histopatologia de brânquias e fígado de *T. newnesi*

As lesões histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* estão apresentadas nas Tabelas 3, 4 e 5.

5.2.1 – Histopatologia das brânquias

Na Operação XXII, apenas os peixes utilizados no experimento Gaiola I tiveram suas brânquias retiradas para a análise histopatológica, lembrando que um peixe do controle e outro do grupo Tanque morreram antes do término do experimento. As amostras de brânquias dos peixes do grupo

controle apresentaram hipertrofia do epitélio respiratório e alargamento do vaso periférico da lamela secundária, uma condição denominada telangiectasia lamelar. O descolamento do epitélio respiratório foi também observado em menor quantidade. As amostras de brânquias dos peixes do grupo exposto ao esgoto também apresentaram hipertrofia do epitélio respiratório e telangiectasia lamelar. Verificou-se, em um dos peixes amostrados, a hiperplasia das células interlamelares. A hiperplasia é uma condição na qual ocorre o aumento da proliferação de uma população de células, podendo afetar a função e arquitetura do tecido enquanto que a hipertrofia é uma condição na qual ocorre o aumento do tamanho celular, podendo resultar no aumento do órgão ou tecido. Nas amostras branquiais do grupo exposto à água diante dos tanques foram observadas a hipertrofia do epitélio respiratório e telangiectasia lamelar. A análise semiquantitativa, segundo Bernet e colaboradores (1999), pode ser observada na figura 10. Foi calculado o Índice do órgão (I_{org}) de cada peixe analisado, o qual representa o grau de dano a um determinado órgão. Os Índices da brânquia (I_{brq}) dos animais do grupo controle foram 4 e 6, os do grupo Esgoto variaram de 1 a 5 e os do grupo Tanque foram 5 e 7. Pela análise das médias, o controle e o grupo Tanque apresentaram índice maior do que o grupo Esgoto, porém, pelo teste estatístico, não houve diferença significativa entre os grupos.

Nos bioensaios realizados durante a Operação XXIII, as alterações mais expressivas, observadas nas amostras de brânquias dos peixes dos grupos controles, foram descamação do epitélio, telangiectasia lamelar e hipertrofia. Nas amostras dos grupos expostos ao esgoto, as alterações mais freqüentes também foram hipertrofia do epitélio respiratório, telangiectasia lamelar e descamação do epitélio. Em menor quantidade, foi observado o descolamento do epitélio, infiltração de leucócitos no epitélio da lamela secundária, fusão das extremidades de lamelas secundárias e edema. Nas amostras branquiais dos peixes dos grupos expostos à água diante dos tanques, as alterações principais foram hipertrofia e descamação do epitélio respiratório. Além disso, observou-se também, em alguns casos, o descolamento do epitélio da lamela secundária, infiltração de leucócitos, telangiectasia lamelar e fusão das extremidades de lamelas secundárias. No Bioensaio III, os Índices da brânquia do grupo controle variaram de 1 a 8, os do

grupo Esgoto variaram de 2 a 10 e os do grupo Tanque, de 3 a 4 (Figura 11). No Bioensaio IV, os Índices da brânquia do grupo controle variaram de 3 a 7, os do grupo Esgoto, de 3 a 5 e os do grupo Tanque foram 2 e 4 (um peixe do grupo morreu) (Figura 12). No Bioensaio V, os Índices da brânquia do grupo controle variaram de 0 a 3, os do grupo Esgoto variaram de 1 a 4 e os do grupo Tanque, de 2 a 5 (Figura 13). Não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos nos bioensaios III e V. Contudo, no Bioensaio V, os grupos expostos apresentaram índices maiores do que o controle e o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Pela análise das médias do Bioensaio IV, o grupo controle apresentou índice maior do que os grupos expostos, porém, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Apesar disso, o teste estatístico não apresentou diferenças significativas entre os grupos.

Os peixes do grupo controle do experimento Gaiola III (n = 2), da Operação XXIV, apresentaram amostras branquiais contendo muitas alterações (Figura 14 A e B). Hipertrofia e descolamento foram as lesões mais evidentes, porém, verificou-se também a presença de descamação, telangiectasia lamelar e hiperplasia de células interlamelares. Foi observada em algumas lamelas secundárias a necrose do epitélio respiratório, representada pela degeneração do epitélio dessas lamelas. Nas amostras dos animais do grupo exposto ao esgoto, observou-se principalmente a hipertrofia e o descolamento do epitélio da lamela secundária, mas alterações como fusão de extremidades de lamelas secundárias (Figura 14 C) e hiperplasia de células interlamelares também foram observadas. Um dos peixes deste grupo apresentou necrose do epitélio respiratório. No grupo exposto à água diante dos tanques, a lesão mais encontrada nas amostras foi a hipertrofia enquanto que telangiectasia lamelar, fusão das extremidades de lamelas secundárias, descamação (Figura 14 D) e hiperplasia de células interlamelares apareceram em menor quantidade. Os Índices da brânquia do grupo controle foram 10 e 20, os do grupo Esgoto variaram de 3 a 7 e os do grupo Tanque, de 0 a 6 (Figura 15). Pela análise das médias, o grupo controle apresentou índice maior do que os outros grupos e o grupo Esgoto, maior do que o grupo Tanque. Segundo o teste estatístico Kruskal-Wallis, houve diferença significativa entre o controle e os dois tratamentos ($p < 0,05$), porém, no teste *a posteriori* de Mann-Whitney

essa diferença não foi observada (p = 0,050708), embora possa ser considerada significativa pelo fato do valor de “p” ser muito próximo a 0,05.

No Bioensaio VI, a amostra de um dos peixes do grupo controle não apresentou alterações branquiais (Figura 17 A) e a do outro apresentou hiperplasia de células interlamelares e fusão das extremidades de lamelas secundárias. A amostra do terceiro peixe do controle foi perdida durante o processamento. Nas amostras do grupo exposto ao esgoto, foi observada principalmente a hipertrofia. Porém, também houve descamação do epitélio, telangiectasia e hiperplasia (Figura 17 B). As alterações mais evidentes, nas amostras do grupo exposto à água diante dos tanques, foram a hipertrofia e a telangiectasia lamelar (Figura 17 C). Contudo, foram observadas também descamação e hiperplasia de células interlamelares. Os Índices de brânquia do grupo controle foram 0 e 8, os do grupo Esgoto variaram de 3 a 5 e os do grupo Tanque, de 2 a 4 (Figura 16). Pela análise das médias, o controle apresentou índice maior do que os grupos expostos e o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque, porém, não houve diferença estatisticamente significativa dos Índices da brânquia entre os grupos.

Comparando os resultados de dois anos de amostragem de experimentos com as gaiolas, os da Gaiola I, da Operação XXII, com os da Gaiola III, da Operação XXIV, não foi verificada diferença significativa entre os Índices da brânquia em nenhum dos grupos (Tabela 6). Entre os bioensaios realizados na Operação XXIII e XXIV, também não houve diferença interanual significativa entre os grupos (Tabela 7).

5.2.2 – Histopatologia do fígado

As amostras dos grupos controles dos experimentos Gaiola I (n = 2) e Gaiola II (n = 3) realizadas na Operação XXII apresentaram um fígado contendo grande quantidade de gotículas lipídicas no citoplasma dos hepatócitos, além da presença de células fagocitárias (macrófagos) fortemente coradas e focos de células basofílicas. Foram observadas também, em alguns animais, a congestão dos vasos sangüíneos e alterações na morfologia nuclear dos hepatócitos. Na amostra dos grupos expostos à água da saída do esgoto foi verificada a presença de grande quantidade de inclusões lipídicas, sob a

forma de vacúolos arredondados e bem delimitados, no interior dos hepatócitos. Já os macrófagos apresentaram o citoplasma com variedades na intensidade da reação histoquímica, indicando fases diferenciadas do processo de digestão intracelular. Foram também observados focos de necrose e de células basofílicas, congestão de vasos sangüíneos e alterações na morfologia nuclear dos hepatócitos em alguns dos animais. No parênquima das amostras dos grupos expostos à água da frente dos tanques (Gaiola I, n = 2 e Gaiola II, n = 4) foram observados hepatócitos com grande quantidade de inclusões lipídicas, semelhantemente ao observado nos animais dos demais grupos. Além disso, foram observadas células de atividade fagocitária, focos de células basofílicas, congestão de vasos e alterações na morfologia nuclear dos hepatócitos. O Índice do fígado (I_{fig}) foi calculado para cada peixe analisado. No experimento de Gaiola I, os Índices do grupo controle foram 11 e 7, os do grupo Esgoto variaram de 8 a 11 e os do grupo Tanque foram igual a 5. Pela análise das médias, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o controle e do que o grupo Tanque (Figura 18). No experimento de Gaiola II, os Índices do grupo controle variaram de 2 a 11, os do grupo Esgoto, de 7 a 13 e os do grupo Tanque variaram de 3 a 11 (Figura 19). O controle apresentou índice menor do que os grupos expostos e o grupo Tanque apresentou índice maior do que o grupo Esgoto. Entretanto, não houve diferenças estatisticamente significativas dos Índices do fígado entre os grupos em ambos os experimentos *in situ*.

No Bioensaio I, as amostras do grupo controle apresentaram menor ocorrência de vacuolizações lipídicas e grandes focos de células basofílicas. Não houve a ocorrência de macrófagos em atividade fagocitária. Nas amostras do grupo exposto à água da saída do esgoto, foram verificados uma grande quantidade de inclusões lipídicas e focos de células basofílicas. Em uma das amostras foi observada a presença de células fagocitárias. No grupo exposto à água da frente dos tanques (n = 2), uma das amostras de fígado apresentou grande quantidade de inclusões lipídicas e células basofílicas enquanto a outra não apresentou nenhum tipo de lesão hepática. Os Índices do fígado do grupo controle variaram de 0 a 6, os do grupo Esgoto, de 3 a 5 e os do grupo Tanque foram 0 e 6 (Figura 20). Pela análise das médias, os grupos Esgoto e Tanque apresentaram índice maior do que o controle e o grupo Esgoto apresentou

índice maior do que o grupo Tanque. Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Na Operação XXIII, foram obtidas amostras hepáticas apenas dos peixes do Bioensaio III. Os fígados dos peixes amostrados apresentaram características muito parecidas às observadas anteriormente. Contudo, não foi verificada a presença de células fagocitárias em nenhum grupo. Nas amostras do grupo controle, os hepatócitos apresentaram grande quantidade de vacuolizações lipídicas, alterações na morfologia nuclear dos hepatócitos, além de focos de necrose. Nas amostras do grupo exposto ao esgoto, também foi observada a ocorrência de gotículas lipídicas no interior dos hepatócitos de quase todos os peixes analisados. Em um dos peixes do grupo foi verificada ainda a congestão dos vasos sangüíneos. Na região próxima ao sinusóide, observou-se a presença de células parenquimais com citoplasma basófilo e núcleos com a cromatina densa e fortemente corada. Na exposição à água diante dos tanques (n = 3), as amostras de fígado apresentaram parênquima sem alterações, porém, em algumas regiões, foram observadas células parenquimais agrupadas e dispersas, com citoplasma fortemente basófilo, contendo vacúolos claros e núcleos bem corados, maiores que os dos hepatócitos circundantes. Em um dos exemplares, foi observada também a congestão dos vasos sangüíneos. Os índices do fígado do grupo controle variaram de 1 a 13, os do grupo Esgoto, de 0 a 7 e os do grupo Tanque, de 0 a 5 (Figura 21). O grupo controle apresentou índice maior do que os grupos expostos, porém, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa dos Índices entre os grupos.

Os peixes do grupo controle do experimento de Gaiola III, amostrados na Operação XXIV, apresentaram um fígado contendo muitas inclusões lipídicas, além de células fagocitárias e focos de células com citoplasma basófilo (Figura 24 A). Durante o experimento, houve a mortalidade da maioria dos peixes deste grupo, restando apenas dois indivíduos para a amostragem. Foram observados focos de necrose na amostra de fígado de um dos exemplares (Figura 24 B) e alterações na morfologia nuclear dos hepatócitos do outro, além das outras alterações mencionadas. Nas amostras do grupo exposto ao esgoto (n = 4), foram observadas alterações semelhantes ao do

grupo controle (Figura 24 C), porém, em uma amostra foi também verificada a congestão dos vasos sangüíneos. Nas amostras dos animais expostos à água diante dos tanques, os fígados apresentaram um parênquima mais homogêneo, com moderada presença de inclusões lipídicas e de células fagocitárias. Focos de células basofílicas foram observadas em todos os grupos (Figura 24 D). Os Índices do fígado do grupo controle foram 8 e 11, os do grupo Esgoto variaram de 4 a 15 e os do grupo Tanque, de 1 a 8 (Figura 22). Pela análise das médias, o controle apresentou índice maior do que os outros grupos, porém, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Pelo teste estatístico, entretanto, não houve diferença significativa dos Índices entre os grupos.

Os peixes do Bioensaio VI apresentaram, de uma maneira geral, um parênquima hepático sem alterações, em todos os grupos (Figura 25). Nas amostras do grupo exposto ao esgoto, notou-se pouca vacuolização nos hepatócitos e presença moderada de células basofílicas. Uma amostra apresentou também a congestão dos vasos sangüíneos. Não foi observada a presença de macrófagos em atividade fagocitária em nenhum dos grupos. Os Índices do fígado do grupo controle foram iguais a 0, os do grupo Esgoto variaram de 2 a 6 e os do grupo Tanque, de 0 a 1 (Figura 23). O controle apresentou índice menor do que os grupos expostos e o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Houve diferença significativa entre os Índices dos grupos controle e Esgoto ($p < 0,05$) e entre os Índices dos grupos Esgoto e Tanque ($p < 0,05$).

Fazendo uma comparação interanual dos dados obtidos com os experimentos com gaiolas, durante as Operações XXII e XXIV, não houve diferença significativa entre os Índices do fígado em nenhum dos grupos analisados (Tabela 8). Entre os bioensaios realizados nas Operações XXII, XXIII e XXIV, houve diferença significativa apenas entre os Índices dos grupos controle dos Bioensaios III e VI (Tabela 9).

5.2.2.1 – Histoquímica do fígado

A coloração pela técnica histoquímica do PAS evidenciou a presença de grânulos de glicogênio no interior dos hepatócitos. O glicogênio é um

polissacarídeo armazenado nas células hepáticas como reserva energética. De maneira semelhante à utilizada para calcular o Índice do órgão, foi obtido o Índice do glicogênio, modificado de Bernet e colaboradores (1999). Os resultados sobre os Índices do glicogênio dos experimentos *in situ* são apresentados na figura 26 e os resultados dos bioensaios, na figura 27. Nos experimentos realizados na Operação XXII, os grupos controle das Gaiolas I e II e do Bioensaio I não apresentaram reação ao PAS, assim como os grupos Esgoto e Tanque do experimento Gaiola II. Os Índices do glicogênio do experimento Gaiola I foram iguais a 0 no grupo controle e iguais a 0 e 1 tanto no grupo Esgoto como no grupo Tanque. Pela análise das médias, o grupo controle apresentou índice menor do que os grupos expostos e o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. No Bioensaio I, os Índices foram 0 e 2, no grupo controle, 0 e 1, no grupo Esgoto e 1 e 2, no grupo Tanque. Pela análise das médias, o grupo Tanque apresentou índice maior do que os outros grupos. Na Gaiola II, os Índices foram 0 e 1, no grupo controle e 0 nos outros grupos. No Bioensaio III, realizado na Operação XXIII, o grupo controle apresentou reação ao PAS mais intensa que os grupos Esgoto e Tanque. Os Índices do glicogênio variaram de 1 a 3, no grupo controle, de 0 a 3, no grupo Esgoto e de 0 a 1, no grupo Tanque. No Bioensaio VI e na Gaiola III, o grupo controle também apresentou reação mais intensa que os outros grupos. Os Índices do Bioensaio VI variaram de 2 a 4, no grupo controle, no grupo Esgoto foram 0 e 5 e no grupo Tanque, 0 e 3. Na Gaiola III, os Índices foram 4 e 5 , no controle, variaram de 3 a 5, no grupo Esgoto e no grupo Tanque foram 0 e 3. Pela análise das médias, o controle apresentou o maior índice, porém, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Os experimentos *in situ* e os bioensaios realizados durante as Operações XXII e XXIII e o Bioensaio 6, da Operação XXIV não apresentaram diferenças estatisticamente significativas dos Índices do glicogênio entre os grupos. Entretanto, no experimento Gaiola 3, realizado na Operação XXIV, houve diferença significativa dos Índices do glicogênio entre o controle e o grupo Tanque ($p < 0,05$). O material fagocitado, contido nos macrófagos do parênquima hepático dos peixes, não apresentou reação positiva ao PAS em nenhum dos experimentos.

A coloração pela técnica de Perls evidenciou a presença de pigmentos férricos dispersos no fígado, contudo não os evidenciou no interior dos macrófagos. Da mesma maneira, a coloração com Hematoxilina e Eosina não demonstrou a presença de melanina nos macrófagos.

A coloração com Rosenfeld visava evidenciar a presença de infiltrações de leucócitos no interior do parênquima hepático. Entretanto, não foram observados infiltrados de leucócitos em nenhuma das amostras hepáticas analisadas, indicando a ausência de focos inflamatórios no tecido.

5.2.2.2 – Análise da densidade de macrófagos e de focos de células basofílicas

A análise das lâminas de fígado dos animais utilizados nos experimentos *in situ* e nos bioensaios apresentou um resultado interessante. A presença de células fagocíticas em atividade foi verificada principalmente no material obtido dos peixes expostos nas gaiolas, em todos os tratamentos, inclusive nos controles, exceto no Bioensaio I, da Operação XXII, no qual foi verificada a presença dessas células, porém com uma densidade muito baixa, sendo observadas apenas no grupo Esgoto. Estas células apresentaram-se como grandes manchas ou vacúolos contendo material celular fagocitado.

Os resultados da análise da densidade de macrófagos podem ser observados na figura 28. Houve diferença estatisticamente significativa na quantidade de macrófagos somente entre o controle e o grupo exposto á água coletada diante dos tanques no experimento de Gaiola I, da Operação XXII ($p < 0,05$).

Fazendo uma comparação interanual, observou-se uma diferença significativa na quantidade de células fagocíticas entre o controle da Gaiola I, da Operação XXII e da Gaiola III, da Operação XXIV. Houve também diferença significativa na quantidade de macrófagos entre os grupos Esgoto da Gaiola II, da Operação XXII e da Gaiola III, da Operação XXIV (Tabela 10).

Focos de células basofílicas foram observados em todos os espécimes analisados, de todos os experimentos, tanto *in situ* como nos bioensaios. Todos os tratamentos apresentaram essas células, inclusive os controles. As células basofílicas apresentaram-se agrupadas em focos de maior ou menor

extensão e também isoladas. Ao microscópio de luz, observou-se um formato irregular dessas células, núcleo muitas vezes também irregular, fortemente basófilo, porém com nucléolo evidente e citoplasma basófilo e vacuolizado. Os resultados da análise da densidade de células basofílicas podem ser observados na figura 29. De acordo com o teste estatístico não-paramétrico Kruskal-Wallis, houve diferença significativa na quantidade de células basofílicas no Bioensaio I ($p < 0,05$). Porém, o teste *a posteriori* de Dunn não evidenciou a diferença entre os grupos. No Bioensaio III, houve diferença significativa na quantidade de células basofílicas entre o controle e os grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível ($p < 0,05$). No Bioensaio VI, realizado na Operação XXIV, não foi observada diferença significativa na quantidade de células basofílicas entre os grupos.

Nos experimentos *in situ* da Operação XXII, somente na Gaiola I houve diferença significativa na quantidade de células basofílicas, de acordo com o teste estatístico Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). Contudo, o teste *a posteriori* de Dunn não evidenciou essa diferença. No experimento de Gaiola III, realizado na Operação XXIV, foi observada diferença significativa na quantidade de células basofílicas entre os peixes expostos à água coletada diante da saída de esgoto e os peixes expostos à água coletada diante dos tanques de combustível ($p < 0,05$).

Na comparação interanual dos bioensaios, houve diferença significativa na quantidade de células basofílicas dos animais expostos à água coletada diante da saída de esgoto entre os Bioensaios I e III ($p < 0,05$), das Operações XXII e XXIII, respectivamente. Houve, também, diferença significativa na quantidade de células basofílicas dos peixes expostos à água coletada diante dos tanques de combustível entre os Bioensaios I e VI ($p < 0,05$), das Operações XXII e XXIV, respectivamente e entre os Bioensaios III e VI ($p < 0,05$), das Operações XXIII e XXIV, respectivamente (Tabela 11).

A comparação interanual dos experimentos *in situ* apresentou diferença significativa na quantidade de células basofílicas dos animais expostos à água coletada diante da saída de esgoto entre as Gaiolas II e III ($p < 0,05$), das Operações XXII e XXIV, respectivamente. No grupo dos peixes expostos à água coletada diante dos tanques de combustível foi observada diferença

significativa na quantidade de células basofílicas entre as Gaiolas I e II ($p < 0,05$), da Operação XXII e entre as Gaiolas II e III ($p < 0,05$), das Operações XXII e XXIV, respectivamente (Tabela 12).

5.2.2.3 – Ultra-estrutura do fígado

A análise ultra-estrutural do fígado de *T. newnesi* foi realizada em apenas um animal de cada grupo experimental do Bioensaio VI e da Gaiola III, realizados na segunda fase da Operação XXIV. Foram escolhidas as amostras que estavam melhor conservadas e que apresentavam todas as características descritas na microscopia de luz, a fim de complementar esta análise com detalhes mais refinados.

O espécime do grupo controle, da Gaiola III, apresentou uma amostra contendo hepatócitos com o citoplasma alterado (Figura 30 A). Foram observados lisossomos secundários, no interior dos quais foi possível observar figuras de mielina (Figura 30 B), resultantes da degeneração de organelas celulares membranosas e cisternas de retículo endoplasmático liso (Figura 30 C), cuja função, entre outras, é fazer a desintoxicação do fígado. Foi observada também uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso. Os macrófagos apresentaram grande quantidade de lisossomos primários e secundários (Figura 30 D), indicando uma alta atividade fagocítica, representada também pela presença de figuras de mielina. As células basofílicas apresentaram alta eletrondensidade, formato poligonal, núcleo periférico e muitas inclusões no citoplasma. A amostra do grupo Esgoto apresentou hepatócitos com formato poligonal, núcleo esférico e central, com cromatina frouxa e nucléolo bem evidente. O citoplasma apresentou grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso e vacúolos eletronlúcidos. Foi observada a presença de células poligonais eletrondensas bastante vacuolizadas e com muito retículo endoplasmático rugoso (Figura 30 E). No grupo Tanque, foram observados hepatócitos contendo muitas inclusões de variada eletrondensidade no citoplasma (Figura 30 F). As células eletrondensas também apresentaram grande vacuolização citoplasmática. Foram observados macrófagos contendo grande quantidade de lisossomos e figuras de mielina.

Na análise das amostras do grupo controle, do Bioensaio VI, foi possível confirmar a estrutura mais preservada do parênquima hepático, como observado na microscopia de luz. Foram observados hepatócitos com citoplasma homogêneo, contendo muitas mitocôndrias e poucas vacuolizações lipídicas, núcleo arredondado e central, pouca quantidade de heterocromatina, geralmente associada à carioteca e também dispersa entre a eucromatina, e nucléolo grande localizado no centro do núcleo (Figura 31 A). Nas amostras dos grupos Esgoto e Tanque foram observadas as mesmas características que as do grupo controle, entretanto, foram bastante evidentes focos de células eletrondensas, no interior das quais foi possível observar grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, no grupo Esgoto (Figura 31 B) e inclusões de variada eletrondensidade no citoplasma dos hepatócitos, no grupo Tanque (Figura 31 C).

5.2.3 – Índice total (Tot-I)

O Índice total é uma medida que representa o estado geral de saúde do organismo baseado nas alterações histológicas. É calculado pela somatória de todas as alterações, de todos os padrões de reação, de todos os órgãos analisados de um organismo.

Todos os espécimes utilizados nos experimentos, *in situ* ou bioensaios, dos quais amostras de brânquias e fígado foram coletadas tiveram o Índice total calculado (Gaiola I, Bioensaio III, Gaiola III e Bioensaio VI).

Os resultados dos Índices totais dos experimentos *in situ* e bioensaios podem ser vistos na figura 32. Os Índices totais do grupo controle do experimento Gaiola I, realizado durante a Operação XXII, foram 13 e 15, os do grupo Esgoto variaram de 9 a 16 e os do grupo Tanque foram 10 e 12. Pela análise das médias, o grupo controle apresentou índice maior do que os grupos expostos, porém, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que o grupo Tanque. Os Índices totais do grupo controle do Bioensaio III, realizado na Operação XXIII, variaram de 9 a 15, os do grupo Esgoto, de 2 a 13 e os do grupo Tanque, de 4 a 9. Apesar de não ter havido diferença estatística, o grupo controle apresentou índice maior do que os grupos expostos e o grupo Esgoto, maior do que o grupo Tanque. No experimento Gaiola III, da Operação XXIV,

os Índices totais, para o grupo controle foram 18 e 31, para o grupo Esgoto, os Índices variaram de 9 a 21 e para o grupo Tanque, variaram de 1 a 12. Pela análise das médias, o controle também apresentou o maior índice, seguido do grupo Esgoto. No Bioensaio VI, os Índices totais do grupo controle foram 0 e 8, os do grupo Esgoto variaram de 5 a 9 e os do grupo Tanque, de 3 a 5. Pela análise das médias, o grupo Esgoto apresentou índice maior do que os outros grupos. Pelo teste estatístico, não foi verificada diferença significativa dos índices entre os grupos em nenhum dos experimentos.

A comparação interanual entre os experimentos Gaiola I e Gaiola III não apresentou diferença estatisticamente significativa dos Índices totais entre os grupos controle, Esgoto e Tanque (Tabela 13), assim como nos Bioensaios III e VI (Tabela 14).

6 – Discussão

No presente estudo, foram analisados o potencial genotóxico das águas coletadas diante dos tanques de armazenamento de combustível e da saída de esgoto da EACF e as lesões histopatológicas resultantes da exposição a essas águas utilizando peixes da espécie *Trematomus newnesi* como bioindicadores. Foram realizados dois tipos de abordagem: experimentos em laboratório, por meio de bioensaios, e experimentos *in situ*, utilizando gaiolas. Alguns estudos de monitoramento ambiental utilizaram gaiolas para expor peixes de diferentes espécies, inclusive no ambiente antártico (Jiménez *et al.*, 1999; Phan *et al.*, 2007), e os resultados foram satisfatórios. Entretanto, Winter e colaboradores (2005) verificaram que as respostas de *Leusciscus cephalus* em relação a peixes selvagens foram menores, mas que isso poderia ser resolvido ajustando os tempos de exposição. Para os autores, um tempo curto de exposição seria insuficiente para os tecidos dos peixes engaiolados se equilibrarem com o ambiente. Os bioensaios no laboratório foram realizados como uma ferramenta de apoio, uma vez que as condições na Antártica são muito adversas e instáveis, dificultando os trabalhos externos. Isso pode ser constatado pelo fato de não haver dados de experimentos *in situ* na Operação XXIII.

A aplicação do Ensaio do Micronúcleo em células de peixes tem obtido bons resultados no monitoramento do potencial genotóxico de diferentes substâncias químicas e de misturas complexas tanto sob condições controladas de laboratório como no campo (Çavas & Ergene-Gozukara, 2005a). Nos últimos anos, diversos estudos descreveram a presença de anormalidades nucleares, além do micronúcleo, em células de peixes expostos a substâncias genotóxicas (Carrasco *et al*, 1990; Pacheco & Santos, 1996) e assim passaram a ser utilizadas para complementar a contagem de micronúcleos em estudos de mutagenicidade (Çavas & Ergene-Gozukara, 2005b). Embora os mecanismos envolvidos na formação dessas anormalidades não estejam completamente compreendidos, vários trabalhos indicam a sua indução em resposta à exposição a agentes genotóxicos. Ayllon & Garcia-Vazquez (2000) observaram anormalidades eritrocitárias em *Phoxinus phoxinus* após tratamento com colchicina, mitomycin-C e

ciclofosfamida. Este ensaio também obteve sucesso em diferentes espécies de peixes como, *Anguilla anguilla* (Pacheco & Santos, 1997; 2001), *Dicentrarchus labrax* (Gravato & Santos, 2002) e *Oncorhynchus mykiss* (Ayllon & Garcia Vazquez, 2001).

Neste estudo, não foram observadas diferenças significativas na freqüência de ANE e dos outros parâmetros (Mn, R, L e S) entre os grupos expostos e os controles em nenhum dos experimentos *in situ* e bioensaios realizados durante o verão nas Operações XXIII e XXIV. Entretanto, Phan e colaboradores (2007) verificaram diferenças significativas na freqüência de ANE e dos parâmetros Mn e R entre os controles e os grupos expostos às águas coletadas diante dos tanques de combustível e da saída de esgoto em bioensaios realizados durante duas expedições anteriores; Operações XXI (2002/2003) e XXII (2003/2004). No experimento *in situ* realizado na Operação XXI, apenas o grupo exposto à água da saída de esgoto apresentou diferença significativa na freqüência de ANE, Mn e R em relação ao controle. Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que analisando cada parâmetro de forma isolada, a lesão do tipo R foi a que apresentou a maior freqüência nos experimentos, enquanto que a lesão do tipo S foi a menos freqüente. O grupo controle apresentou freqüência de R menor do que a dos grupos expostos na maioria dos experimentos e de maneira geral, o grupo Esgoto apresentou freqüência de R maior do que a do grupo Tanque (Figuras 7, 8 e 9). Estes resultados, portanto, sugerem uma tendência da água da saída do esgoto apresentar maior potencial genotóxico do que a água diante dos tanques de combustível, confirmando parcialmente os resultados obtidos por Phan e colaboradores (2007).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são substâncias químicas amplamente distribuídas no ambiente aquático, provenientes principalmente de fontes antropogênicas. A maior preocupação em torno dos HPAs é o seu potencial mutagênico (Myers *et al.*, 1991) e carcinogênico (Stein *et al.*, 1990) sobre os organismos aquáticos. Muitos trabalhos já relataram a indução de micronúcleos e de anormalidades nucleares eritrocitárias por HPAs em peixes. Alguns compostos são comprovadamente mutagênicos, como o benzo[a]pireno (Metcalfe, 1988; Al-Sabti, 1986), porém no campo, é mais comum encontrar os HPAs em misturas complexas, e estas também

apresentam potencial clastogênico (Hose *et al.*, 1987; Al-Sabti & Hardig, 1990) Trabalhos mais recentes avaliaram também os efeitos de β-naftoflavona e de efluentes de refinarias de petróleo, demonstrando a sua capacidade de induzir danos genotóxicos em organismos aquáticos (Pacheco & Santos, 1997; 2001; 2002; Gravato & Santos, 2002; Çavas & Ergene-Gozukara, 2005b).

Na Antártica, o despejo de esgoto doméstico, produzido pelas estações de pesquisa, pode representar uma importante fonte de poluição aquática na região. A EACF é uma das poucas estações que possui sistema de tratamento de efluentes antes de lançá-los ao mar. Vários trabalhos documentaram o potencial genotóxico do lodo ou de extratos de esgoto doméstico. Ottaviani e colaboradores (1993) realizaram ensaios utilizando *Salmonella typhimurium* para testar a mutagenicidade do lodo de esgoto de uma estação de tratamento. Esses autores constataram que em esgotos municipais tratados aerobicamente não há quantidades significativas de compostos mutagênicos para bactérias. Jha e colaboradores (1997) não verificaram o potencial genotóxico do esgoto municipal primário, sob condições *in vivo* utilizando o poliqueta *Platynereis dumerilli*, por meio do teste de aberrações cromossômicas. Grisolia & Starling (2001) não detectaram diferenças significativas nas freqüências de micronúcleos nos eritrócitos de *Tilapia rendalli*, *Oreochromis niloticus* e *Cyprinus carpio* capturados em um lago eutrofizado de Brasília-DF. Portanto, muitos dos estudos envolvendo esgoto municipal indicam que este não apresenta atividade mutagênica, mesmo utilizando testes de bactérias *in vitro*. Entretanto, neste estudo, de modo geral, os grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto apresentaram maior indução de ANE e principalmente do parâmetro R do que os grupos expostos à água coletada diante dos tanques. A composição de efluentes de esgoto pode ser muito complexa. Além de matéria orgânica e microrganismos, detergentes, hormônios, HPAs, metais pesados, entre outros, podem estar presentes em altas concentrações e causar danos aos organismos aquáticos (Tyler *et al.*, 1998; Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002; Song et al., 2006).

Pela análise das figuras 7 e 9, pode-se notar que os animais dos grupos controles dos Bioensaios II e III, da Operação XXIII e da Gaiola III, da Operação XXIV, apresentaram freqüências de ANE ou de um dos outros parâmetros (Mn, L, R e S) maiores, apesar de não significativas, que as dos

grupos expostos. A formação de Mn ocorre espontaneamente em peixes e a freqüência de Mn espontâneos (controle) pode variar dependendo do método utilizado e da manipulação dos animais. Nem toda substância que induz a formação de micronúcleos é clastogênica (Al-Sabti & Metcalfe, 1995). Micronúcleos também podem surgir pela não-disjunção devido à exposição a agentes que destroem o fuso mitótico (Heddle et al, 1991). Existem também fatores fisiológicos e físicos, como idade, sexo, dieta, estado reprodutivo e de saúde (Al-Sabti & Metcalfe, 1995), susceptibilidade individual (Depledge, 1994) e temperatura (Brunetti *et al.*, 1992a, b) que podem modificar as freqüências de micronúcleos em animais aquáticos. A variação também pode resultar da coincidência entre o momento da coleta do material e o período em que ocorre a resposta máxima de indução de micronúcleos (OECD, 1997; Vanparys *et al.*, 1992). Descartadas essas hipóteses, pode-se supor que nos experimentos citados os grupos controle tenham sofrido algum tipo de contaminação. Como já mencionado nos métodos, os grupos controle dos bioensaios da Operação XXIII foram mantidos com água coletada pela bomba da Estação e armazenada nos tanques do laboratório, antes de ser filtrada e utilizada. Este procedimento talvez elimine as substâncias mais voláteis, mas provavelmente não elimina todas as substâncias tóxicas contidas na água. Esta bomba está localizada diante da Estação, num ponto situado entre os tanques de combustível e a saída de esgoto. Entretanto, esta foi uma medida necessária levando-se em conta as adversidades climáticas que coincidiram com o período dos experimentos. No experimento Gaiola III, da Operação XXIV, somente dois espécimes de *T. newnesi* do grupo controle puderam ser amostrados ao fim do período de exposição devido à mortalidade dos outros indivíduos. É possível que a alta freqüência de ANE esteja relacionada ao estresse e à condição de debilidade em que se encontravam esses animais no momento da amostragem.

Apesar de suas vantagens, a aplicação do ensaio de Mn em eritrócitos possui algumas limitações como a possibilidade de confundir uma lesão nuclear com uma necrose viral nos eritrócitos (Carrasco et al, 1990). Para aumentar a sensibilidade, técnicas de coloração mais específicas foram desenvolvidas, como a do acridine orange (Ueda et al, 1992), que utiliza fluorescência e tem a capacidade de diferenciar os eritrócitos jovens dos

maduros e a técnica de Feulgen, que utiliza o reagente de Schiff, específico para DNA. Outros ensaios de Mn, utilizando diferentes tipos celulares foram desenvolvidos com o intuito de aumentar a sensibilidade e a seletividade do método. O ensaio de Mn hepático foi primeiramente desenvolvido para roedores (Tates et al, 1980), mas logo foi modificado para a aplicação em peixes. Williams & Metcalfe (1992) induziram a formação de Mn no fígado de truta (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando uma substância (allyl formate) para estimular a proliferação dos hepatócitos, uma vez que o fígado não é um tecido que apresenta alta taxa de divisão celular. As brânquias, por sua vez, possuem alta taxa de proliferação celular e também foram utilizadas para a determinação de respostas clastogênicas em peixes (Hayashi et al, 1998; Çavas & Ergene-Gozukara, 2003). Uma vez introduzidos no ambiente marinho, o destino dos possíveis compostos mutagênicos presentes no esgoto dependem de diversos fatores, que podem levar tanto a sua ativação ou mais freqüentemente a sua detoxificação (De Flora et al, 1991). Em geral, as substâncias genotóxicas que agem diretamente são moléculas reativas que tendem a degradar rapidamente via decomposição química, bioquímica ou fotoquímica. Os pró-mutagênicos, como o benzo[a]pireno, requerem ativação metabólica e são mais estáveis. O ensaio de Mn hepático é especialmente útil para substâncias que necessitam de transformação metabólica no fígado para originar compostos intermediários ativos (Williams & Metcalfe, 1992), enquanto que a vantagem de se utilizar células branquiais deve-se a esse órgão ficar em contato direto com os poluentes presentes na água. Justamente por essas características, as brânquias dos peixes são órgãos bastante utilizados na avaliação histológica para determinação dos efeitos da poluição (Poleksić & Mitrović-Tutundžić,1994; Schwaiger *et al.*, 1997; Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002).

Os danos histopatológicos nas brânquias consistiram principalmente em hipertrofia do epitélio respiratório, telangiectasia lamelar e descamação do epitélio respiratório. A descamação do epitélio é resultado da ruptura do epitélio em diversos pontos, conferindo à lamela um aspecto “descabelado”. Segundo Temmink e colaboradores (1983 *apud* Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002), a ruptura do epitélio branquial reflete os efeitos deletérios diretos das substâncias tóxicas nas brânquias. A presença destas alterações nos grupos controle pode ser um sinal de contaminação da água em que foram mantidos. Apenas no Bioensaio

V, da Operação XXIII, o grupo controle apresentou Índice menor do que os grupos expostos. Na Gaiola III, da Operação XXIV, os grupos expostos apresentaram índices significativamente menores do que o controle. Apesar de não significativo, o grupo Esgoto apresentou índices maiores do que os do grupo Tanque nos Bioensaios IV e V, da Operação XXIII, Gaiola III e Bioensaio VI, da Operação XXIV. As alterações branquiais decorrentes da exposição a algum poluente geralmente têm a função de impedir a entrada do xenobiótico no organismo. Seriam, portanto, reações de defesa. A severidade das lesões depende da concentração do contaminante e do período de exposição (Oliveira-Ribeiro et al., 1996). Além disso, estas alterações podem acarretar sérias conseqüências para as funções fisiológicas das brânquias, principalmente para as trocas gasosas (Nero *et al.*, 2006). Segundo Neiboer & Richardson (1980 *apud* Koca *et al.*, 2005) o descolamento do epitélio pode estar relacionado à redução da ATPase Na^+K-ativada da brânquia e/ou com o declínio das concentrações de Na^+ e Cl^- no sangue, afetando diretamente as funções osmorregulatórias do órgão. A fusão das lamelas secundárias pode causar a redução da superfície do epitélio respiratório, prejudicando as trocas gasosas. Por outro lado, aumentam a distância da barreira água-sangue e junto com o descolamento do epitélio e o aumento da secreção de muco, podem diminuir drasticamente o consumo de oxigênio (Koca *et al.*, 2005). Se o agente irritante não for removido, pode levar à ruptura dos vasos sangüíneos e formação de pequenos focos hemorrágicos (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002). As lesões branquiais encontradas neste estudo também foram observadas nas brânquias de peixes expostos a metais pesados (Randi *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1999) e surfactantes (Rosety-Rodriguez *et al.*, 2002). Diversos autores descreveram alterações na estrutura branquial de peixes expostos a metais pesados. Estas alterações estavam principalmente relacionadas a hipoxemia (oxigenação insuficiente do sangue), causada pela hiperplasia e fusão das lamelas secundárias, resultando na redução da capacidade de difusão das brânquias. Oliveira-Ribeiro e colaboradores (2000) compararam os danos branquiais causados por mercúrio inorgânico em peixes tropicais e nórdicos e verificaram que as respostas dos peixes de regiões boreais ao poluente são menores que as dos peixes tropicais, indicando que a baixa temperatura diminui a eficiência de absorção do poluente da água. Não foram encontradas

informações a respeito da comparação das respostas de *T. newnesi* exposto a poluentes com espécies de peixes tropicais que pudessem indicar este comportamento em peixes antárticos.

A análise microscópica do tecido hepático de *T. newnesi* submetido ao processamento histológico revelou que os exemplares dos grupos experimentais e dos controles apresentaram um ou mais sinais de comprometimento do órgão. A alteração histopatológica mais evidente foi a presença de inclusões lipídicas no citoplasma dos hepatócitos, características do processo patológico denominado lipidose. Esta condição apresentou-se em todos os tratamentos, tanto nos bioensaios quanto nos experimentos *in situ*, contudo, observou-se uma variação na intensidade da manifestação, principalmente no Bioensaio VI (Figura 25). Os lipídios desempenham um papel-chave na fisiologia dos peixes antárticos. Uma estratégia adaptativa é a predominância da oxidação de lipídios para obtenção de energia ao invés da oxidação de carboidratos. Outras funções dos lipídios nos nototenióides são acelerar a difusão do oxigênio nas células, auxiliar na flutuabilidade e fornecer energia durante o inverno austral, período em que a disponibilidade de alimento é menor (Kamler *et al.*, 2001). Deste modo, a presença de lipídios nos órgãos dos peixes antárticos é uma condição considerada normal, embora seja uma característica sujeita a variações intrínsecas (idade, sexo, tamanho, modo de vida) ou extrínsecas (temperatura, dieta) ao animal. Kamler e colaboradores (2001) observaram que o fígado de peixes do sexo feminino geralmente é maior e armazena mais lipídios do que o fígado de indivíduos do sexo masculino, principalmente na época que antecede a formação das gônadas. Além disso, os autores constataram que o conteúdo de lipídios nos peixes antárticos reflete o seu habitat; peixes bênticos contêm menos lipídios do que peixes pelágicos, uma vez que não dependem tanto da flutuabilidade. *T. newnesi* é uma espécie de peixe demersal, que habita regiões desde a zona entremarés até mais de 100 m de profundidade. A questão, portanto, é se as inclusões lipídicas observadas nos hepatócitos de *T. newnesi* expostos às águas coletadas diante dos tanques de combustível e da saída de esgoto da EACF refletem uma condição normal ou patológica. Foi evidente a variação na intensidade de ocorrência de gotículas lipídicas no fígado dos animais nos diversos experimentos (Figuras 24 e 25) e por isso esta característica foi

incluída na análise semiquantitativa, contudo, seriam necessários estudos mais detalhados para responder a essa questão. Enquanto o acúmulo de lipídios pode ser uma reserva fisiológica normal, pode também ser uma defesa contra contaminantes lipossolúveis (Biagianti-Risbourg *et al.*, 1997).

Os resultados da análise semiquantitativa mostraram que, nos experimentos realizados na Operação XXII, o grupo Esgoto apresentou os maiores índices do fígado, exceto no experimento Gaiola II, no qual o grupo Tanque apresentou índice maior. No Bioensaio VI, da Operação XXIV, o grupo Esgoto foi significativamente diferente do grupo controle. Contudo, no Bioensaio III, da Operação XXIII e na Gaiola III, da Operação XXIV, o grupo controle apresentou os maiores índices, evidenciando mais uma vez a possível contaminação do grupo controle nesses experimentos. Hepatócitos com citoplasma degenerado e núcleo disforme foram observados por meio da microscopia eletrônica de transmissão no fígado do peixe do grupo controle do experimento Gaiola III. Macrófagos contendo grandes quantidades de lisossomos indicaram a ocorrência do processo de digestão intracelular em atividade principalmente pela presença de figuras de mielina no seu interior.

A presença de macrófagos pigmentados, mesmo que não dispostos em agregados celulares, também é referida na literatura disponível como um sinal de comprometimento do órgão (Marty *et al.*, 1999). Os macrófagos, observados no fígado dos peixes submetidos aos experimentos *in situ*, apresentaram grande variação à reação histoquímica do seu conteúdo citoplasmático (Figura 24 A). Koca e colaboradores (2005) observaram numerosas estruturas vacuolares, de diversos tamanhos, preenchidas com detritos celulares e muitas partículas escuras no fígado de *Lepomis gibbosus*. Esta alteração histológica no tecido hepático foi atribuída à resposta das células de Kupfer (responsáveis pela desintoxicação) aos diversos poluentes no Ribeirão Çine. Diversos estudos relataram a presença de centros de melanomacrófagos no fígado de peixes expostos a contaminantes. Os agregados de macrófagos pigmentados estão envolvidos no armazenamento de material estranho e sua predominância e intensidade foi proposta como um potente biomarcador de degradação e poluição ambiental (Couillard & Hodson, 1996). Neste estudo, os macrófagos foram observados tanto nos grupos expostos como nos controles. No experimento Gaiola I, da Operação XXII, a quantidade de macrófagos no grupo

controle foi maior do que nos grupos expostos. Stentiford e colaboradores (2003) documentaram a ocorrência de centros de melanomacrófagos em amostras hepáticas de locais utilizados como controle, contudo, a freqüência destas estruturas foi maior nas amostras de peixes capturados em locais contaminados por HPAs. Os autores atribuem a presença de melanomacrófagos em peixes coletados em locais relativamente livres de contaminação ao fato destas estruturas estarem envolvidas em diversas funções metabólicas e que, portanto, podem não estar necessariamente associadas à exposição a poluentes. A presença de melanomacrófagos em peixes utilizados como controle precisa ter uma base quantitativa estabelecida, de modo que comparações possam ser realizadas com animais de locais contaminados (Teh *et al*., 1997). Entretanto, de um modo geral, considerando todos os experimentos em que houve ocorrência de macrófagos em atividade, o grupo Esgoto apresentou maior quantidade do que o grupo Tanque.

Nas amostras dos animais da Operação XXIII, a reação histoquímica não evidenciou a atividade fagocitária dos macrófagos hepáticos, assim como no Bioensaio VI, da Operação XXIV, mas por outro lado, a presença de células parenquimais de acentuada basofilia citoplasmática podem ser um sinal de comprometimento do órgão (Figura 29). Nos experimentos Gaiola I e Gaiola III, o grupo Tanque apresentou o maior número de células basofílicas. Bogovski e colaboradores (1999), examinando nódulos hepáticos em linguados (*Platichthys flesus*) do Mar Báltico encontraram três tipos de lesão celular: 1) adenoma hepatocelular basofílico ou eosinofílico; 2) focos de alteração celular basofílico, eosinofílico ou claro e 3) desordens de acúmulos intracitoplasmáticos. Os autores afirmam que existem diferentes abordagens utilizadas para classificar tumores e focos de alteração celular pré-neoplásticas, assim como lesões degenerativas e regenerativas específicas em fígado de peixes. Testes de carcinogenicidade em truta arco-íris consideraram que pequenos focos de hepatócitos basofílicos deveriam ser interpretados como estágios iniciais de adenomas ou carcinomas hepatocelulares (Bailey *et al.*, 1996), e assim poderiam servir como um excelente biomarcador histopatológico para exposição a poluentes. A ocorrência de focos de alteração celular basofílicos foi documentada em fígados de linguados capturados em locais contaminados com altos níveis de HPAs (Stentiford *et al.*, 2003). Nos

experimentos Gaiola I e Gaiola III foi observada uma maior ocorrência de células basofílicas no grupo Tanque, sendo que na Gaiola III a diferença em relação ao grupo controle foi estatisticamente significativa.

A condição relativa dos hepatócitos, em termos de produtos metabólicos de reserva (lipídios, glicogênio) pode ser afetada pela disponibilidade de alimento, ciclo reprodutivo, estação do ano e pelo sexo do peixe (Vethaak & Wester, 1996). O glicogênio é uma das formas de armazenamento de energia, encontrado em grande quantidade nos tecidos do fígado e músculo dos peixes. O glicogênio hepático é considerado um estoque emergencial de energia prontamente disponível e é um nutriente muito utilizado em adaptações bioquímicas em várias situações de estresse ambiental (Cyrino *et al.*, 2000). Os animais utilizados nos bioensaios receberam alimentação até 24 horas antes do final dos experimentos. Os peixes colocados nas gaiolas também tinham acesso à alimentação, uma vez que seu alimento natural, os anfípodas, é bastante abundante na região e podia penetrar através das grades das gaiolas. Neste estudo, foi calculado o Índice do glicogênio. Na Gaiola I, o grupo Esgoto apresentou maior índice, seguido do grupo Tanque. Na Gaiola III, Bioensaio III e Bioensaio VI, o grupo controle apresentou os maiores índices. No Bioensaio I, o grupo Tanque apresentou o maior índice. Com estes resultados, observou-se a tendência do grupo controle apresentar reserva de glicogênio maior do que os grupos expostos. Entretanto, a análise do Ensaio de micronúcleos e de outras anormalidades nucleares e os índices da brânquia e do fígado indicaram a possível contaminação do grupo controle dos experimentos Gaiola III e Bioensaio III. Portanto, são necessários outros estudos para determinar a função do glicogênio em *T. newnesi*. Teh e colaboradores (1997) verificaram uma associação entre a depleção de glicogênio nos hepatócitos e o aumento da basofilia citoplasmática destas células em peixes de locais de referência e contaminados, porém nestes últimos, a alteração foi mais severa. Neste estudo, esta associação não foi observada. Segundo Oliveira-Ribeiro e colaboradores (2005), o glicogênio como biomarcador pode ser ambíguo. A exposição a alguns poluentes pode causar tanto a depleção como o aumento de glicogênio nos hepatócitos. Um dado interessante é que animais em condições de exposição crônica podem desenvolver tolerância fisiológica aos contaminantes, não apresentando

resposta a eles (Thomas *et al.*, 1999). Quanto ao Índice total, de modo geral, foi observada uma tendência do grupo Esgoto apresentar o maior índice em todos os experimentos analisados, apesar dos grupos controle dos experimentos Gaiola I, Gaiola III e Bioensaio III terem, na realidade, apresentado índices maiores do que os grupos expostos. Novamente, é necessário ressaltar a possível contaminação destes grupos, como já mencionado.

Estudos realizados após grandes derramamentos de óleo no oceano (Marty *et al.*,1999; Marty *et al.*, 2003) detectaram várias alterações hepáticas desde o ano em que ocorreu o episódio até vários anos depois e concluíram que diversos fatores podem estar relacionados com a presença dessas lesões, como a diferença entre os locais de coleta e a idade do indivíduo, além dos efeitos provocados pela toxicidade do óleo. Algumas das alterações encontradas não foram claramente relacionadas à contaminação dos locais de coleta por óleo, como: depleção de glicogênio, que ocorreu em todos os peixes; lipidose, agregados de melanomacrófagos, cariomegalia e hepatócitos multinucleados (Marty *et al.*, 1999). O tamanho, histologia, e composição (principalmente de lipídios) do fígado podem variar em função do tamanho, sexo, maturidade sexual, estação do ano, doenças e estado nutricional do peixe. Portanto, qualquer estudo que tenha como objetivo investigar os efeitos do óleo, ou qualquer outro poluente ambiental, no fígado deve controlar essas variáveis ou encontrar um meio de levá-las em conta (Fletcher *et al.*, 1982).

O estudo de Bucher & Hofer (1993) verificou o efeito do esgoto doméstico tratado sobre três órgãos da truta marrom (Salmo trutta), fígado, brânquias e rim. Em seus experimentos, as primeiras alterações hepáticas começaram a se manifestar após 53 dias de tratamento com esgoto diluído a 42%. Após 80 dias de exposição, os animais deste grupo experimental apresentaram lesões hepáticas evidentes, na forma de necrose de células isoladas. Os animais expostos à menor concentração (13%) não apresentaram alterações aparentes na histologia do órgão. Eles apontam a amônia e o nitrito como os principais componentes tóxicos dos efluentes de esgoto doméstico e observaram uma maior preferência dos peixes por locais ricos em nutrientes.

Em um estudo realizado por Evans e colaboradores (2000), próximo à Estação Antártica Americana “McMurdo”, peixes da espécie *Trematomus*

bernacchii coletados em Winter Quarters Bay (local poluído) apresentaram uma maior variedade de patologias do que os peixes coletados em Backdoor Bay (controle). A análise histopatologica revelou brânquias e fígado particularmente afetados. Assim como no presente estudo, exatamente quais substâncias poderiam ser as responsáveis pelas alterações observadas não está claro, porém em seu trabalho, Evans e colaboradores (2000) atribuíram as patologias observadas em *T. bernacchii* principalmente a poluentes orgânicos como HPAs e PCBs, ou patógenos introduzidos pelo esgoto da Estação McMurdo, embora estivessem estudando os efeitos de metais pesados. Segundo Arellano e colaboradores (1999), peixes expostos ao metal cobre apresentaram aumento da vacuolização lipídica nos hepatócitos, vênulas e sinusóides congestos e necrose hepatocelular. O sistema de tratamento de esgoto da EACF foi construído para atender uma população de cerca de 50 pessoas. Apesar de seu funcionamento ser eficiente, quebras mecânicas e vazamentos acidentais podem ocorrer ocasionalmente e contaminar a região costeira adjacente (Martins *et al.*, 2002). Na área de estudo, a principal fonte de HPAs é a EACF, devido ao transporte e uso de combustíveis. O combustível mais utilizado na EACF é o diesel DFA, composto principalmente por naftaleno, naftalenos alquilados e outros hidrocarbonetos aromáticos semivoláteis com 3 ou 4 anéis (Kennicutt II *et al.*, 1991). Martins e colaboradores (2002; 2004) encontraram altas concentrações de hidrocarbonetos e de esteróis totais no sedimento próximo à saída de esgoto da EACF, entretanto, verificaram que essas concentrações diminuem com o aumento da distância da fonte. Concentrações relativamente altas de fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno e criseno, indicativos de contaminação por óleo, foram encontradas neste local. Apesar disso, os níveis de HPAs encontrados na área de estudo são similares a de outros locais pouco contaminados na Antártica (Martins *et al.*, 2004). Entretanto, valores relativamente altos de n-alcanos e baixos níveis de HPAs foram detectados em Punta Plaza (Martins et al., 2004), próximo ao local onde foram mantidos os grupos controle nos experimentos *in situ*, neste estudo. A presença de HPAs indica uma pequena contribuição de óleo, cuja origem foi atribuída ao tráfego de navios na Baía do Almirantado. Estudos prévios sobre a dispersão de esteróis fecais indicaram que Punta Plaza não recebe contribuição do esgoto da EACF, porém, ocasionalmente, reversões da

corrente marinha da Baía podem transportar material fecal para este lugar (Martins *et al.*, 2002). Isso poderia explicar a elevada ocorrência de alterações histopatológicas e indução de Mn e ANE nos grupos controle dos experimentos *in situ*, embora não possa ser confirmado. Analisando as comparações anuais entre os grupos controle dos experimentos *in situ* e bioensaios, não foram verificadas diferenças significativas em nenhum dos itens analisados, exceto no Índice do fígado entre os Bioensaios III e VI e na quantidade de macrófagos entre as Gaiolas I e III. É interessante notar que não houve diferença nos demais itens analisados entre os bioensaios mesmo quando a água utilizada no grupo controle foi coletada em lugares bastante afastados da EACF (Bioensaio VI). Houve diferença significativa na freqüência de Mn, na quantidade de macrófagos e de células basofílicas em peixes expostos à água diante da saída de esgoto em experimentos realizados em anos diferentes. Nos peixes expostos à água diante dos tanques de combustível houve diferença anual apenas na quantidade de células basofílicas entre os experimentos. Essas diferenças podem indicar variação nas respostas individuais dos peixes ou no nível de contaminação do local em função das atividades realizadas na EACF. Os experimentos *in situ* Gaiola III e Gaiola IV foram realizados no mesmo ano, porém em fases diferentes. No período de realização desses experimentos, a EACF estava com a capacidade de ocupação máxima, o que significa maior utilização de combustíveis e geração de esgoto. Foi observada uma diferença significativa na freqüência de ANE e R nos peixes expostos diante dos tanques de combustível entre os dois experimentos. Isso poderia ser causado por uma maior utilização de combustível e também pelo aporte de contaminantes do solo devido ao degelo que os transporta para as águas costeiras, com o avanço do verão.

As análises realizadas no presente estudo foram baseadas em um pequeno número de indivíduos (2-5). Com um número amostral desta magnitude, uma pequena variação individual pode acarretar diferenças significativas, que podem não refletir a realidade e limitam a possibilidade de extrapolação dos dados para uma população inteira. Entretanto, devido ao pequeno número de peixes coletados, à restrição de tempo e às condições climáticas, que às vezes foram desfavoráveis, não foi possível realizar

experimentos utilizando um número maior de espécimes. Neste estudo, tanto os grupos controle como os grupos expostos apresentaram Mn e ANE e alterações histopatológicas no fígado e brânquias. Isso pode ser evidência da ocorrência de múltiplos agentes estressantes no ambiente, que podem alterar a integridade das células e tecidos. Estes agentes podem incluir: parasitas, variações ambientais, aumento de competição, aglomeração, alteração de disponibilidade de alimento e habitat, entre outros (Adams, 1990). O uso de biomarcadores sem conhecimento prévio da tolerância intrínseca dos organismos às diferentes classes de contaminantes pode causar diagnósticos imprecisos (Oliveira-Ribeiro *et al.*, 2005). Além disso, não se pode esquecer de que os ambientes naturais, especialmente os aquáticos, são muito complexos e dinâmicos e que os organismos sempre estarão expostos a diversos fatores, que podem interagir entre si, alterando a biodisponibilidade e toxicidade dos poluentes e conseqüentemente isto pode se refletir na resposta dos organismos.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram a indução de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias e alterações histopatológicas nas brânquias e fígado de peixes da espécie *T. newnesi* expostos à água do mar diante dos tanques de combustível e da saída de esgoto da EACF. Entretanto, os grupos controle apresentaram as mesmas lesões e em alguns casos apresentaram freqüências de Mn e ANE e índices de lesões histopatológicas maiores do que os grupos expostos. Apesar disso, os dados sugerem uma tendência da saída de esgoto representar o local de maior potencial de risco para peixes da espécie *T. newnesi* na região próxima à Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz”.

7 – Conclusões

Em relação aos danos genotóxicos, a lesão nuclear do tipo R foi mais freqüente do que os outros tipos em todos os experimentos. De modo geral, a freqüência de R foi menor nos controles do que nos grupos expostos, tanto nos bioensaios como nos experimentos *in situ*.

Apesar das freqüências de Mn e ANE dos grupos expostos não terem sido estatisticamente diferentes das dos grupos controle, foi observada uma tendência do grupo Esgoto em apresentar maior indução destas lesões nucleares, confirmando parcialmente os resultados de Phan e colaboradores (2007), na mesma área de estudo.

Foram observadas lesões branquiais e hepáticas tanto nos peixes dos grupos expostos como nos grupos controle. Contudo, entre os grupo expostos, o grupo Esgoto apresentou maior índice de lesões do que o grupo Tanque.

Foi evidente a variação na intensidade de ocorrência de gotículas lipídicas no fígado dos animais nos diversos experimentos, porém, são necessários estudos mais detalhados para determinar se essa variação reflete uma condição normal ou patológica.

Da mesma forma, é necessário, também, conhecer aspectos importantes da fisiologia de *T. newnesi*, como a dinâmica de armazenamento de produtos metabólicos, como o glicogênio e os lipídios intracelulares, para saber a função dessas moléculas no organismo.

Foram observados macrófagos em atividade fagocítica apenas no fígado dos peixes dos experimentos i*n situ*. Além disso, foi verificada sua ocorrência também nos grupos controle. Contudo, os macrófagos estão relacionados a diversas funções metabólicas e sua presença pode não estar necessariamente relacionada ao feito de poluentes.

A presença de células basofílicas pode indicar comprometimento do fígado, sugerindo exposição dos peixes a xenobióticos, entretanto, são necessários mais estudos para determinar a função dessas células no órgão.

A análise ultra-estrutural do fígado de *T. newnesi* permitiu a visualização de várias organelas celulares, como retículo endoplasmático rugoso e lisossomos secundários, que podem indicar processos metabólicos em alta atividade como a síntese de proteínas e a digestão celular.

A utilização de um número amostral maior é fundamental para minimizar as diferenças em função das variações individuais e melhorar os resultados das análises estatísticas, além de permitir a extrapolação para níveis mais altos de organização, como o de população.

Para poder interpretar os dados experimentais no contexto real é necessário obter informações detalhadas dos parâmetros hidrográficos e ambientais, assim como realizar análises químicas do local concomitantemente ao estudo a fim de determinar os níveis de contaminação a que os animais estão submetidos.

Embora, neste estudo, não tenha sido estabelecida de fato uma relação de causa e efeito entre as alterações observadas e a contaminação do ambiente, de modo geral, é possível afirmar que a saída de esgoto é o local que representa o maior potencial de dano para peixes da espécie *T. newnesi* na região próxima à Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz”.

8 – Bibliografia

Adams, S. M. 1990. Status and use of biological indicators for evaluating the effects of stress on fish. Am. Fish. Soc. Symp., 8: 1-8.

Adams, S. M.; Shugart, L. R.; Southworth, G. R. & Hinton, D. E. 1990. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: Mccarthy, J. F. & Shugart, L. R. (eds.). Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 333-353.

Al-Sabti, K. 1986. Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. Cytobios, 47: 147-154.

Al-Sabti, K. 1994. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish erythrocyte cells. Mutat. res., 320: 157-163.

Al-Sabti, K. & Hardig, J. 1990. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products in the Baltic Sea, Sweden. Comp. biochem. physiol. C, 97: 179-182.

Al-Sabti, K. & Metcalfe, C. D. 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutat. res., 343: 121-135.

Arellano, J. M.; Storch, V. & Sarasquete, C. 1999. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. Ecotoxicol. environ. saf., 44: 62-72.

Arellano, J. M.; Ortiz, J. B.; Canales, M. L. G. & Sarasquete, C. 2001. Histopathological alterations and induction of cytochrome P450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Histochem. J., 33 (11-12): 663-674.

Arigony Neto, J. 2001. Determinação e interpretação de características glaciológicas e geográficas com sistema de informações geográficas na Área Antártica Especialmente Gerenciada Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Dissertação de Mestrado em Sensoriamento Remoto. UFRGS-CEPSRM, Porto Alegre. 84p.

Ayllon, F. & Garcia-Vazquez, E. 2000. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: as assessment of the fish micronucleus test. Mutat. res., 467: 177-186.

Ayllon, F. & Garcia-Vazquez, E. 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. Ecotoxicol. environ. saf., 49: 221-225.

Bailey, G. S.; Williams, D. E. & Hendricks, J. D. 1996. Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. Environ. health perspect., 104 (1): 5-21.

Bernet, D.; Schmidt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P. & Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. J. fish dis., 22: 25-34.

Biagianti-Risbourg, S.; Pairault, C.; Vernet, G. & Boulekbache, H. 1997. Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Sac-Fry. Chemosphere, 33: 2065-2079.

Bícego, M. C.; Weber, R. R. & Ito, R. G. 1996. Aromatic hydrocarbons on surface waters of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. Mar. Pollut. Bull., 32 (7): 549-553.

Bogovski, S.; Lang, T. & Mellergaard, S. 1999. Short communication: histopathological examinations of liver nodules in flounder (*Platychthys flesus* L.) from the Baltic Sea. ICES j. mar. sci., 56: 152-156.

Bombail, V.; Aw, D.; Gordon, E. & Batty, J. 2001. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (*Pholis gunnellus*) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. Chemosphere, 44: 383-392.

Brunetti, R.; Gabriele, M.; Valerio, P. & Fumagalli, O. 1992a. The micronucleus test: temporal pattern of base-line frequency in *Mytilus galloprovincialis*. Mar. ecol., Prog. ser., 83: 75-78.

Brunetti, R.; Fumagalli, O.; Valerio, P. & Gabriele, M. 1992b. Genotoxic effects of anoxia on *Mytilus galloprovincialis*. Mar. ecol., Prog. ser., 83: 71-74.

Bucher, F & Hofer, R. 1993. The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*). Water res., 27(2): 255-261.

Carrasco, K. R.; Tilbury, K. L. & Myers, M. S. 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. j. fish. aquat. sci., 47: 2123-2136.

Clark, R. B. 1994. Marine Pollution. 3rd. edition. Oxford: Claredon Press, 172 p.

Couillard, C. M. & Hodson, P. V. 1996. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? Environ. toxicol. chem., 15: 1844-1854.

Cripps, G. C. 1992. Baseline levels of hydrocarbons in seawater of Southern Ocean – natural variability and regional patterns. Mar. Pollut. Bull., 24: 109-114.

Cripps, G. C. & Shears, J. 1997. The fate in the marine environment of a minor diesel fuel spill from an Antarctic Research Station. Environ. monit. assess., 46: 221-232.

Cyrino, J. E. P.; Portz, L. & Martino, R. C. 2000. Retenção de proteína e energia em juvenis de “black bass” *Micropterus salmoides*. Sci. agric., 57 (4): 609-616.

Çavas, T. & Ergene-Gozukara, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgRONs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. Mutat. res., 538: 81-91.

Çavas, T. & Ergene-Gozukara, S. 2005a. Genotoxicity evaluation of metronidazole using the piscine micronucleus test by acridine orange fluorescent staining. Environ. toxicol. pharmacol., 19: 107-111.

Çavas, T. & Ergene-Gozukara, S. 2005b. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquat. toxicol., 74: 264-271.

De Flora, S.; Bagnasco, M. & Zanacchi, P. 1991. Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean Sea. Mutat. res., 258: 285-320.

Depledge, M. H. 1994. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. Environ. health perspect., 102: 101-104.

Donaldson, E. M. 1990. Reproductive indices as measures of the effects of environmental stressors in fish. Am. Fish. Soc. Symp., 8: 109-122.

Evans, C. W.; Hills, J. M. & Dickson, J. M. J. 2000. Heavy metal pollution in Antarctica: a molecular ecotoxicological approach to exposure assessment. J. Fish Biol., 57: 8-19.

Fanta, E.; Rios, F. S; Romão, S.; Vianna, A. C. C. & Freiberger, S. 2003. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with

sublethal levels of organophosphorus in water and food. Ecotoxicol. environ. saf., 54 (2): 119-130.

Ferron, F. A.; Simões, J. C.; Aquino, F. E. & Setzer, A. W. 2004. Air temperature time series for King George Island, Antarctica. Pesqui. antart. bras., 4: 155-169.

Fletcher, G. L.; King, M. J.; Kiceniuk, J. W. & Addison, R. F. 1982. Liver hypertrophy in winter flounder following exposure to experimentally oiled sediments. Comp. biochem. physiol. C, 73: 457-462.

Gravato, C. & Santos, M. 2002. Juvenile sea bass liver P450 EROD induction and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. Ecotoxicol. environ. saf., 51: 115-123.

Grisolia, C. K & Starling, F. L. R. M. 2001. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutat. res., 491: 39-44.

Hayashi, M.; Ueda, T.; Wada, K.; Kinae, N.; Saotome, K.; Tanaka, N.; Takai, A.; Sasaki, Y. F.; Asano, N.; Sofuni, T. & Ojima, Y. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutat. res., 399: 125–133.

Heddle, J. A.; Cimino, M. C.; Hayashi, M.; Romagna, F.; Shelby, M. D.; Tucker, J. D.; Vanprays, Ph. & MacGregor, J. T. 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. Environ. mol. mutagen., 18: 277-291.

Hinton, D. E.; Baumen, P. C.; Gardener, G. C.; Hawkins, W. E.; Hendricks, J. D. Murchelano, R. A & Okhiro, M. S. 1992. Histopathological biomarkers. In: Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle, P. M. & Bergman, H. L. (eds.), Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, p. 155-210.

Hooftman, R. N. & de Raat, W. K. 1982. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pigmea* by ethyl methanesulphonate. Mutat. res., 104: 147-152.

Hose, J. E.; Cross, J. N.; Smith, S. G. & Diehl, D. 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. Mar. environ. res., 22: 167-176.

Hughes, K. A. 2004. Reducing sewage pollution in the Antarctic marine environment using a sewage treatment plant. Mar. Pollut. Bull., 49: 850-853.

Hureau, J. C. 1985. Nototheniidae. In: Fisher, W. & Hureau, J. C (eds.). FAO species identification sheets for fishery purposes. Southern Ocean (Fishing areas 48, 58 e 88). Rome: FAO, Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources, p. 323-385. v.2.

Jha, A. N.; Hutchinson, T. H.; Mackay, J. M.; Elliott, B. M. & Dixons, D. R. 1997. Evaluation of the genotoxicity of municipal sewage effluent using the marine worm *Platynereis dumerilii* (Polychaeta:Nereidae). Mutat. res., 391: 179-188.

Jiménez, B.; Fossi, M. C.; Nigro, M. & Focardi, S. 1999. Biomarker approach to evaluating the impact of scientific stations on the antarctic environment using *Trematomus bernacchii* as a bioindicator organism. Chemosphere, 39 (12): 2073-2078.

Jiraungkoorskul, W.; Upathama, E. S.; Kruatrachuea, M.; Sahaphongc, S; Vichasri-Gramsa, S & Pokethitiyooka, P. 2002. Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sci. Asia, 28: 121-127.

Kamler, E.; Krasicka, B. & Rakusa-Suszczewski, S. 2001. Comparison of lipid content and fatty acid composition in muscle and liver of two notothenioid fishes from Admiralty Bay (Antarctica): an eco-physiological perspective. Polar biol., 24: 735-743.

Kennicutt, M. C. 1990. Oil Spillage in Antarctica. Environ. sci. technol., 24: 620-624.

Kennicutt II, M. C.; Sweet, S. T.; Fraser, W. R.; Stockton, W. L. & Culver, M. 1991. Grounding of the Bahia Paraíso at the Arthur Harbor, Antarctica. 1. Distribution and fate of oil spill related hydrocarbons. Environ. sci. technol., 25: 509-518.

Kennicutt II, M. C.; McDonald, T. J.; Denoux, G. J. & McDonald, S. J. 1992. Hydrocarbon contamination on the Antarctic Peninsula. I. Arthur Harbor – subtidal sediments. Mar. Pollut. Bull., 24: 499-506.

Koca, Y. B.; Koca, S.; Yildiz, S.; Gürcü, B.; Osanç, E.; Tunçbaş, O. & Aksoy, G. 2005. Investigation of histopathological and cytogenetic effects on *Lepomis gibbosus* (Pisces: Perciformes) in the Çine Stream (Aydin/Turkey) with determination of water pollution. Environ. toxicol., 20: 560-571.

Krzyszowska, A. 1990. The content of fuel oil in soil and effect of sewage on water nearby the H. Arctowski Polish Antarctic Station (King George Island). Pol. Arch. Hydrobiol., 37: 313-326.

Levinton, J. S. 1995. Marine Biology: Function, Biodiversity, Ecology. New York: Oxford University Press, 420 p.

Martins, C. C.; Venkatesan, M. I. & Montone, R. C. 2002. Sterols and linear alkylbenzenes in marine sediments from Admiralty Bay, King George Island, South Shetlands Islands. Antarct. sci., 14 (3): 244-252.

Martins, C. C.; Bícego, M. C.; Taniguchi, S. & Montone, R. C. 2004. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. Antarct. sci., 16 (2): 117-122.

Marty, G. D.; Okihiro, M. S.; Brown, E.; Hanes, D. & Hinton, D. E. 1999. Histopathology of adult Pacific herring in Prince William Sund, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Can. j. fish. aquat. sci., 56: 419-26.

Marty, G. D.; Hoffmann, A.; Okihiro, M. S.; Hepler, K. & Hanes, D. 2003. Retrospective analysis: bile hydrocarbons and histopathology of demersal rockfish in Prince William Sound, Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. Mar. environ. res., 56: 569-584.

Metcalfe, C. D. 1988. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). Bull. environ. contam. toxicol., 40: 489-495.

Miller, H. C.; Mills, G. N.; Bembo, D. G.; MacDonald, J. A. & Evans, C. W. 1999. Induction os cytochrome P4501A (CYP1A) in *Trematomus bernacchii* as an indicator of environmental polluiton in Antarctica: assessment by quantitative RT-PCR. Aquat. toxicol., 44: 183-193.

Myers, M. S.; Landahl, J. T.; Krahn, M. M. & McCain, B.B. 1991. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. Environ. health perspect., 90: 7-15.

Myers, M. S.; Johnson, L. L.; Olson, O. P.; Stehr, C. M.; Horness, B. H.; Collier, T. K. & McCain, B. B. 1998. Toxicopathic Hepatic lesions as biomarkers of chemical contaminant exposure and effects in marine bottomfish species from the Northeast and pacific coasts, USA. Mar. Pollut. Bull., 37 (1-2): 92-113.

Neiboer, E. & Richardson, D. H. S. 1980. The replacement of nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. pollut., 1: 3-26.

Nelson, J. S. 1994. Fishes of the world. 3rd. ed., New York: John Wiley & Sons, Inc, 600 p.

Nero, V.; Farwell, A.; Lee, L. E. J.; Van Meer, T.; MacKinnon, M. D. & Dixon, D. G. 2006. The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: gill and liver histopathology. Ecotoxicol. environ. saf., 65: 252-264.

OECD. 1997. Guidelines for the testing of chemicals. 474: 1-10.

Ohe, T.; Watanabe, T & Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review. Mutat. res., 567: 109-149.

Oliveira-Ribeiro, C. A.; Fanta, E.; Turcatti, N. M.; Cardoso, R. J. & Carvalho, C. S. 1996. Lethal effects of inorganic mercury on cells and tissue of *Trichomycterus brasiliensis* (Pisces, Siluroidei). Biocell, 20: 171-178.

Oliveira-Ribeiro, C. A.; Pelletier, E.; Pfeiffer, W. C. & Rouleau§, C. 2000. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. Environ. res., 83: 286-292.

Oliveira-Ribeiro, C. A.; Vollaire, Y.; Sanchez-Chardi, A. & Roche, H. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. Aquat. toxicol., 74: 53-69.

Ortiz-Delgado, J. B.; Sarasquete, C.; Behrens, A.; González de Canales, M. L. & Segner, H. 2002. Expression, cellular distribuiton and induction of cytochrome P4501A (CYP1A) in gilthead seabream, *Sparus aurata*, brain. Aquat. toxicol., 60 (3-4): 269-283.

Ostrander, G. K. 2000. The laboratory fish. San Diego: Academic Press, 678 p.

Ottaviani, M.; Crebelli, R.; Fuselli, S. L. ; Rocca, C. L. & Baldassarri, L.T. 1993. Chemical and mutagenic evaluation of sludge from a large wastewater treatment plant. Ecotoxicol. environ. saf., 26: 18-32.

Pacheco, M. & Santos, M. A. 1996. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of *Anguilla anguilla* L. exposed either to cyclophosphamide or to bleached kraft pulp mill effluent. Fresenius environ. bull., 5: 746-751.

Pacheco, M. & Santos, M. A. 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicol. environ. saf., 38: 252-259.

Pacheco, M. & Santos, M. A. 2001. Biotransformation, endocrine and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmental contaminated waters. Ecotoxicol. environ. saf., 49 (1): 64-75.

Pacheco, M. & Santos, M. A. 2002. Naphthalene and β-naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocitic nuclear abnormalities. Environ. int., 28: 285-293.

Pearce, F. 1994. Oil leaks as Antarctic talks stall. New scientist., 1952: 5.

Phan, V. N.; Gomes, V.; Passos, M. J. A. C. R.; Ussami, K. A.; Campos, D. Y. F.; Rocha, A. J. S. & Pereira, B. A. 2007. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz", King George Island. Polar biol., 30: 209-217.

Pietrapiana, D.; Modena, M.; Guidetti, P.; Falugi, C. & Vacchi, M. 2002. Evaluating the genotoxic damage and hepatic tissue alterations in demersal fish species: a case study in the Ligurian Sea (NW - Mediterranean). Mar. Pollut. Bull., 44: 238-243.

Poleksić, V. & Mitrović-Tutundžić, V. 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: Muller, R. & Lloyd, R. (eds.). Sublethal and chronic effects of pollutants on fresh water fish. Oxford: Fishing News Books, p. 339-352.

Randi, A. S.; Monserrat, J. M. ; Rodriguez, E. M. & Romano, L. A. 1996. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsorbycan uruguayanael* Eigenmann (Pisces, Athainidae). J. fish. dis., 19: 311-322.

Rosety-Rodríguez, M.; Ordoñez, F. J.; Rosety, M.; Rosety, J. M.; Rosety, I.; Ribelles, A. & Carrasco, C. 2002. Morpho-histochemical changes in the gills of turbot, *Scophthalmus maximus* L., induced by sodium dodecyl sulfate. Ecotoxicol. environ. saf., 51: 223-228.

Schwaiger, J.; Wanke, R.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W. & Triebskorn, R. 1997. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. J. aquat. ecosyst. stress recovery, 6: 75-86.

SECIRM/PROANTAR. 2005. Manual do participante de Operações Antárticas. 10ª ed., Brasília – DF: Cidade Gráfica e Editora Ltda, 108 p.

Shailaja, M. S. & D'Silva, C. 2003. Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus*, using multiple biomarkers. Chemosphere, 53: 835-841.

Song, Y. F.; Wilke, B. –M.; Song, X. Y.; Gong, P.; Zhou, Q. X. & Yang, G. F. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated

biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation. Chemosphere, 65: 1859-1868.

Stehr, C. M.; Myers, M. S.; Johnson, L. L.; Spencer, S. & Stein, J. E. 2003. Toxicopathic liver lesions in English sole and chemical contaminant exposure in Vancouver Harbour, Canada. Mar. environ. res., 57 (1-2): 55-74.

Stein, J. E.; Reichert, W. L.; Nishimoto, M.; Varanasi, U. 1990. Overview of studies on liver carcinogenesis in English sole from Puget Sound; evidence for a xenobiotic chemical aetiology: II. Biochemical studies. Sci. total environ., 94: 51-69.

Stentiford, G. D.; Longshaw, M.; Lyons, B. P.; Jones, G.; Green, M & Feist, S. W. 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. Mar. environ. res., 55: 137-159.

Szafránzaki, Z. & Lipski, M. 1982. Characteristics of water, temperature, and salinity at Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Island, Antarctic) during austral summer 1978/1979. Pol. Polar Res., 3: 7-24.

Tates, A. D; Neuteboom, I.; Hofker, M. & den Engelse, L. 1980. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEN/DMN) in hepatocytes of rat liver *in vivo*. Mutat. res., 74: 11.

Teh, S. J.; Adams, S. M. & Hinton, D. E. 1997. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. Aquat. toxicol., 37: 51-70.

Temmink, J.; Bowmeister, P.; de Jong, P. & van den Berg, J. 1983. An ultra structural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquat. toxicol., 4: 165-179.

Thomas, P. 1990. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. Am. Fish. Soc. Symp., 8: 9-28.

Thomas, R. E.; Brodersen, C.; Carls, M. G.; Babcock, M. & Rice, S. D. 1999. Lack of physiological responses to hydrocarbon accumulation by *Mytilus trossulus* after 3-4 years chronic exposure to spilled Exxon Valdez crude oil in Prince William Sound. Comp. biochem. physiol. C, 122: 153-163.

Tumeo, M. A. & Wolk, A. E. 1994. Assessment of the presence of oil-degrading microbes at McMurdo Station. Antarct. J., 29: 375-377.

Tyler, C. R.; Jobling, S. & Sumpter, J. P. 1998. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. CRC crit. rev. toxicol., 28: 319-361.

Ueda, T.; Hayashi, M.; Ohtsuka, Y.; Nakamura, T.; Kobayashi, J. & Sofuni, T. 1992. A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. Water sci. technol., 25: 235-240.

Van Dyk, J. C. 2003. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. Dissertação de mestrado. Faculty of Science, Rand Afrikaans University.

Vanparys, P.; Deknudt, G.; Vermeiren, F. & Sysmans, M. 1992. Sampling times in micronucleus testing. Mutat. Res., 282: 191-196.

Vethaak, A. D. & Wester, P. W. 1996. Diseases of flounder *Platichthys flesus* in Dutch coastal and estuarine waters, with particular reference to environmental stress factors. II. Liver histopathology. Dis. aquat. org., 26: 99-116.

Weber, R. R. & Montone, R. C. 1990. Distribution of organochlorines in the atmosphere of the South Atlantic and Antarctic Oceans. In: Kurtz, D. A. (ed.). Long Range Transport of Pesticides. Chelsea: Lewis Publishers Inc., p. 185-197.

Weber, R. R. & Montone, R. C. 2006. Rede 2 – Gerenciamento ambiental na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Relatório técnico CNPq/PROANTAR. 261p.

Wester, P. W.; van der Ven, L. T. M.; Vethaak, A. D.; Grinwis, G. C. M. & Vos, J. G. 2002. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. Environ. toxicol. pharmacol., 11: 289-295.

Williams, R. C. & Metcalfe, C. D. 1992. Development of an in vivo hepatic micronucleus assay with rainbow trout. Aquat. toxicol., 23: 193-202.

Winter, M. J.; Verweij, F.; Garofalo, E.; Ceradini, S.; McKenzie, D. J.; Williams, M. A.; Taylor, E. W.; Butler, P. J.; van der Oost, R. & Chipman, J. K. 2005. Tissue levels and biomarkers of organic contaminants in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) from rivers in the West Midlands, UK. Aquat. toxicol., 73: 394-405.

FIGURAS

E

TABELAS

◙ Estação Ferraz e localização dos tanques de combustível e saída de esgoto.

● Principal local de captura dos animais experimentais.

¤ Local onde foi mantido o grupo controle, nos experimentos *in situ*.

Figura 1. Localização da Estação Antártica Brasileira "Comandante Ferraz" e dos locais de estudo, na Baía do Almirantado.

Figura 2. A. Vista aérea dos locais de estudo. **B.** Estação Antártica "Comandante Ferraz" (EACF). Tanques de armazenamento de combustível. **C.** EACF. Saída de esgoto, próxima ao heliponto. Terceira fase da Operação XXIII. Notar a pluma avançando para o mar (seta). (A: modificado de fotografia aérea obtida pelo Projeto Criossolos).

Figura 3. *Trematomus newnesi*. Barra = 1cm. (Fotografia modificada por Pablo Basile).

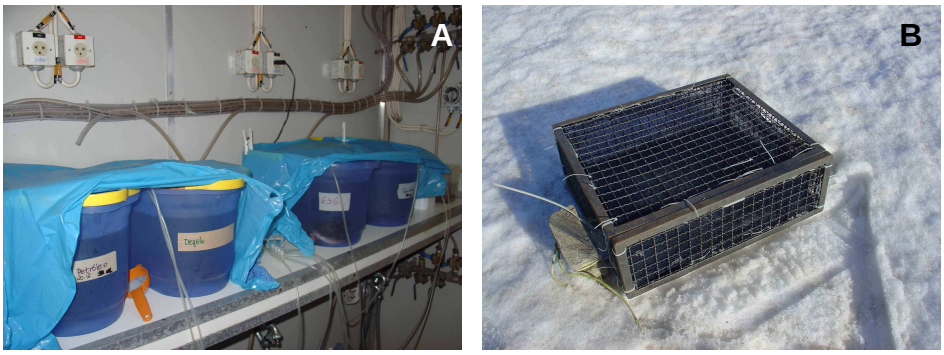


Figura 4. A. Laboratório úmido na EACF. A figura mostra a estrutura e os reservatórios utilizados para a realização dos bioensaios, nos quais os peixes foram expostos à água coletada diante dos tanques de combustível e da saída de esgoto, além dos peixes do grupo controle em água limpa. **B.** Gaiola utilizada nos experimentos *in situ*.

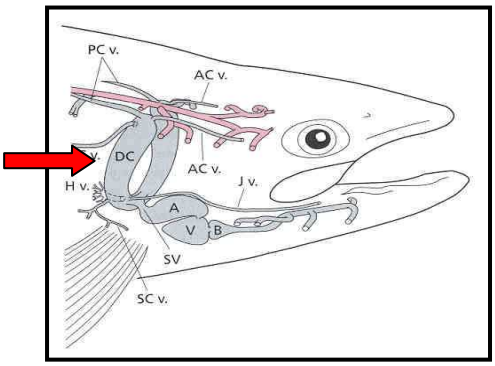


Figura 5. Esquema ilustrativo da região da cabeça de um peixe teleósteo. Duto de Cuvier (seta). Local de obtenção do sangue para os esfregaços. (Ilustração retirada de Ostrander, 2000).

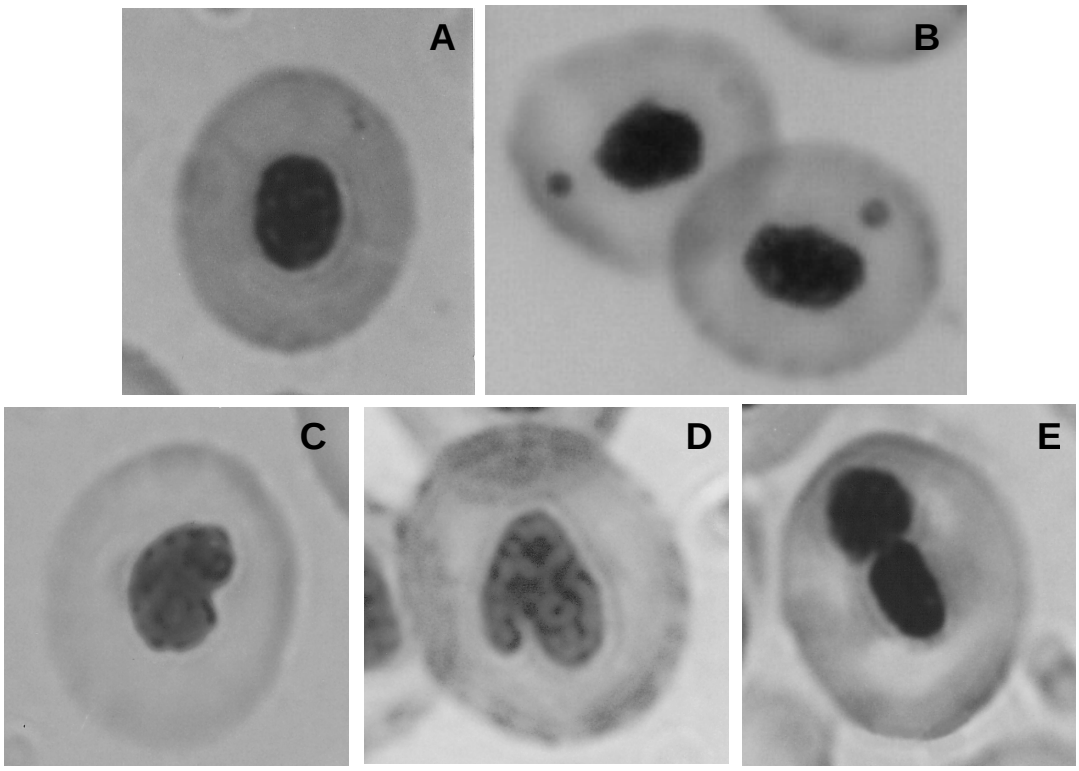


Figura 6. Eritrócitos maduros de *Trematomus newnesi.* **A.** Núcleo normal. **B.** Eritrócitos com micronúcleos. **C.** Núcleo reniforme. **D.** Núcleo lobado. **E.** Núcleo segmentado. Coloração: Giemsa 10%. Aumento: 1000x.

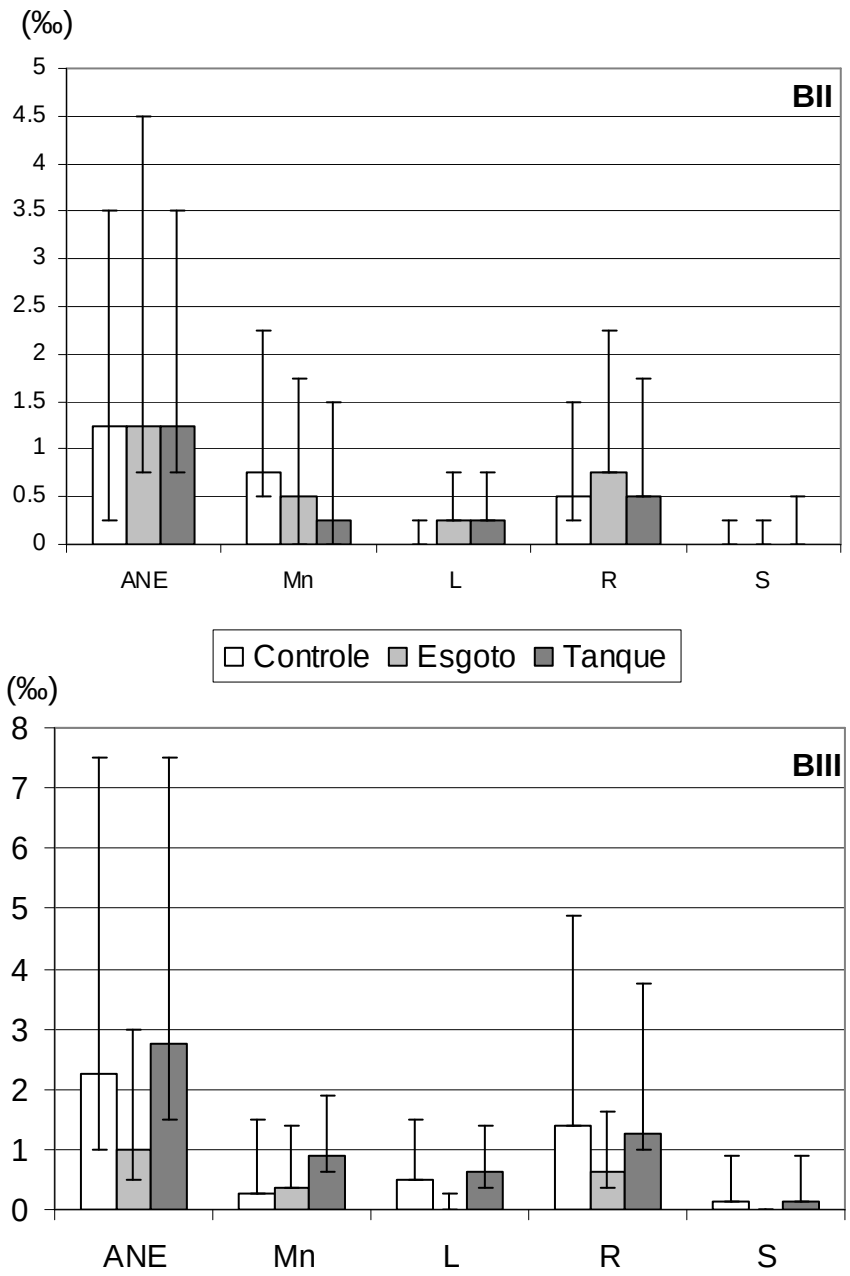


Figura 7. Medianas, valores máximos e mínimos das freqüências (‰) de ANE (Anormalidades nucleares eritrocitárias), Mn (Micronúcleo), L (Lobado), R (Reniforme) e S (Segmentado) no controle e em peixes expostos à água do mar coletada diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível, nos Bioensaios II (BII) e III (BIII), da Operação XXIII.

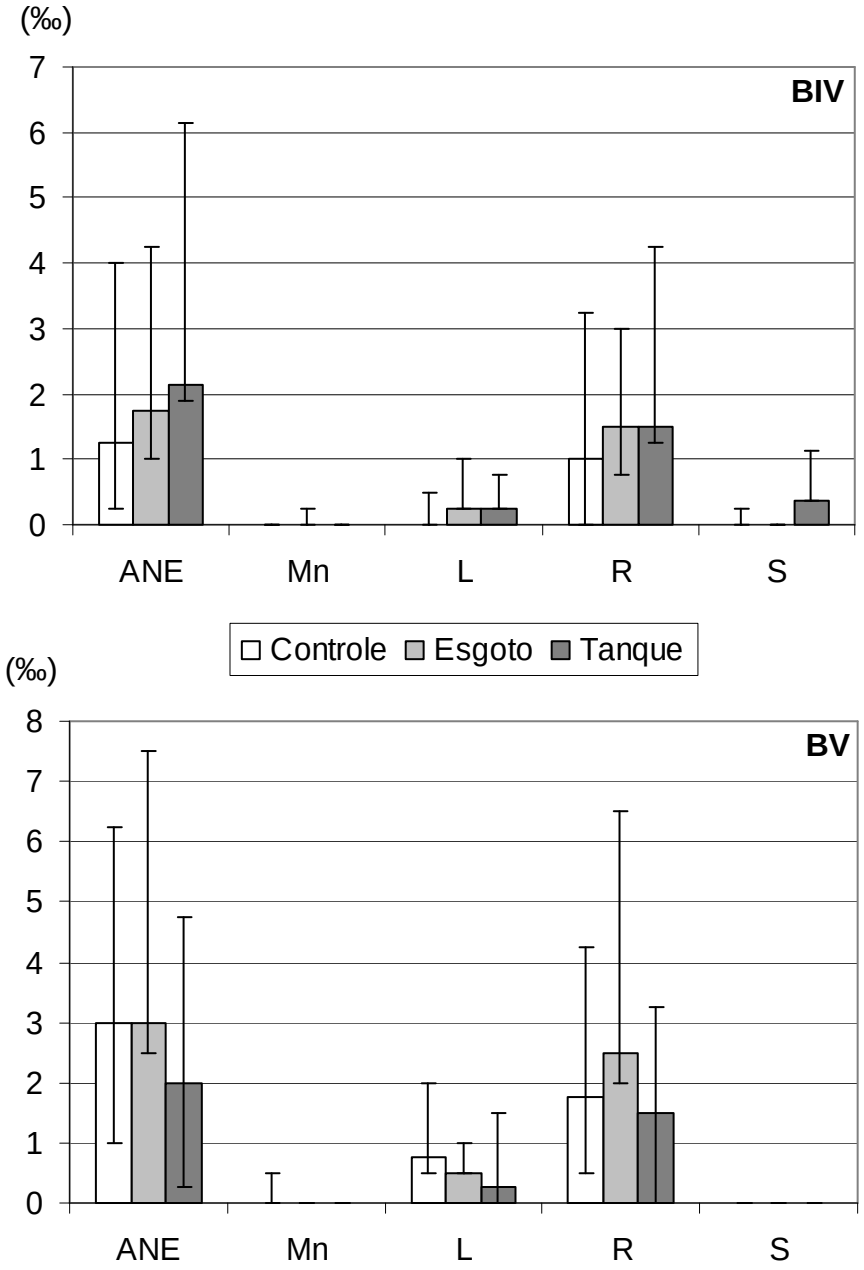


Figura 8. Medianas, valores máximos e mínimos das freqüências (‰) de ANE (Anormalidades nucleares eritrocitárias), Mn (Micronúcleo), L (Lobado), R (Reniforme) e S (Segmentado) no controle e em peixes expostos à água do mar coletada diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível, nos Bioensaios IV (BIV) e V (BV), da Operação XXIII.

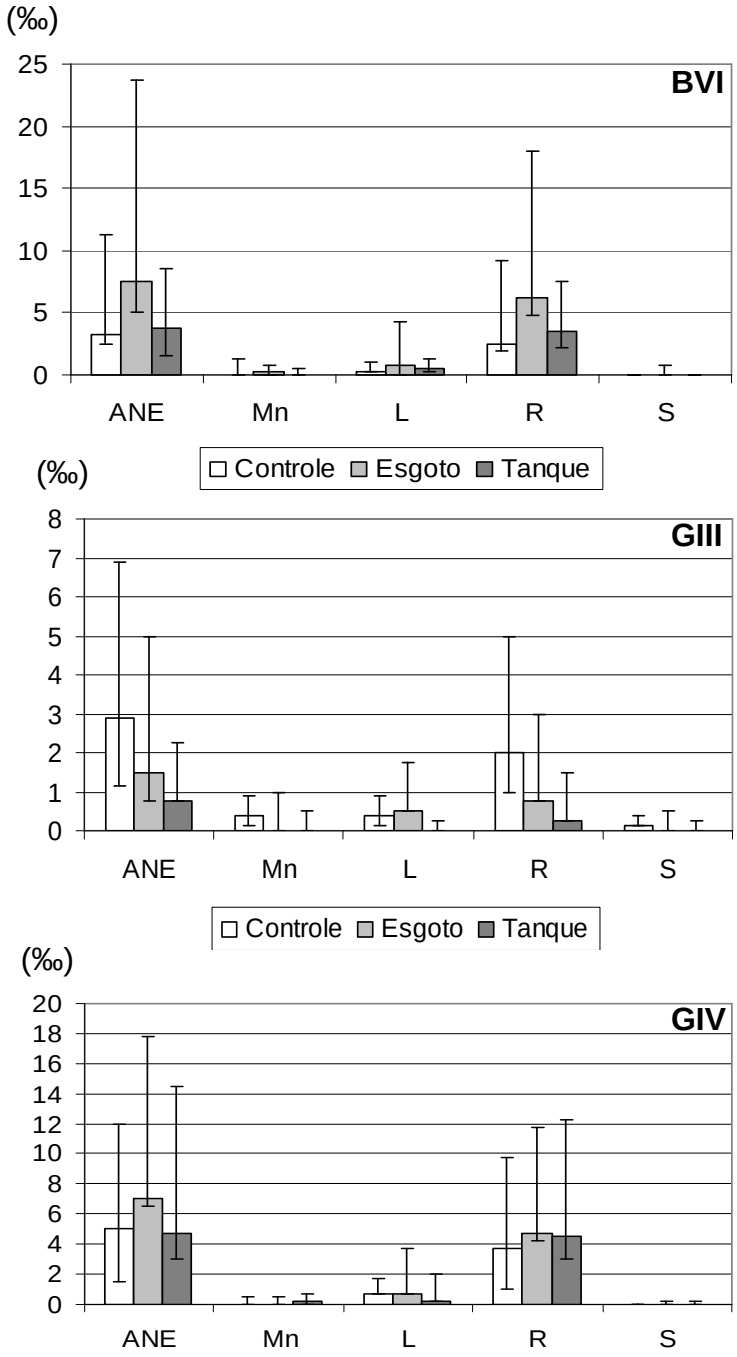


Figura 9. Medianas, valores máximos e mínimos das freqüências (‰) de ANE (Anormalidades nucleares eritrocitárias), Mn (Micronúcleo), L (Lobado), R (Reniforme) e S (Segmentado) no controle e em peixes expostos à água do mar diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível, no Bioensaio VI (BVI) e nos experimentos Gaiola III (GIII) e IV (GIV), da Operação XXIV.

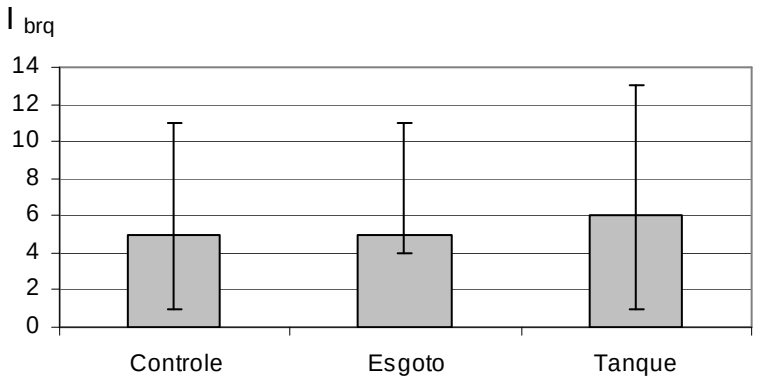


Figura 10. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola I da Operação XXII.

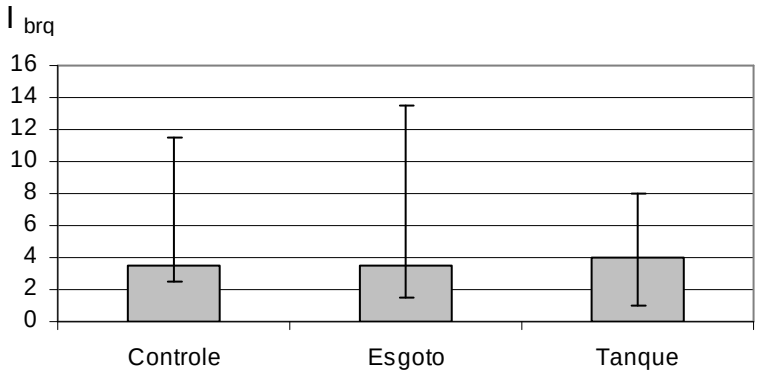


Figura 11. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio III da Operação XXIII.

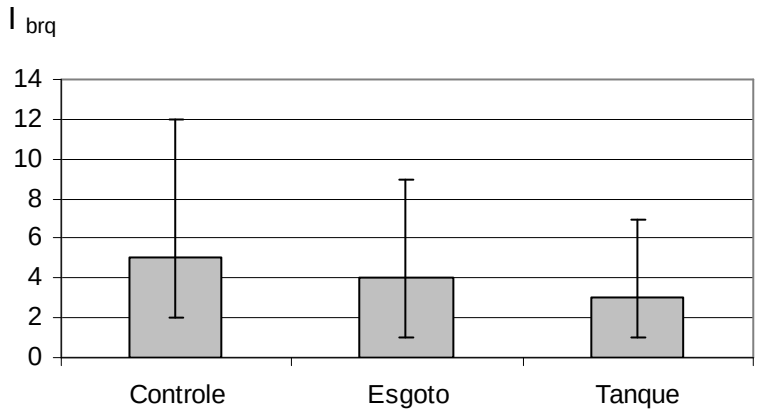


Figura 12. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio IV da Operação XXIII.

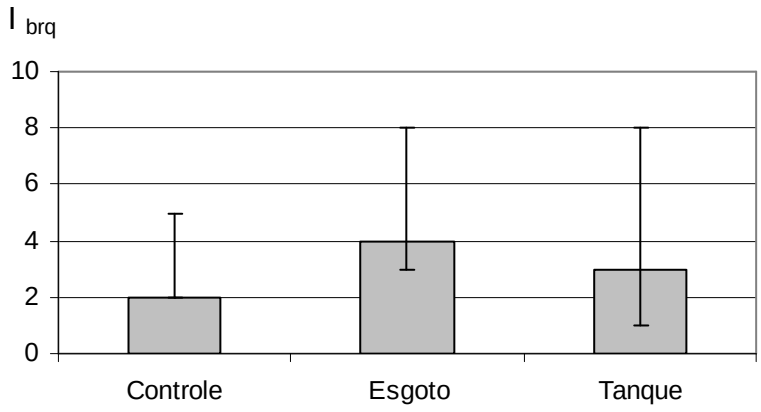


Figura 13. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio V da Operação XXIII.

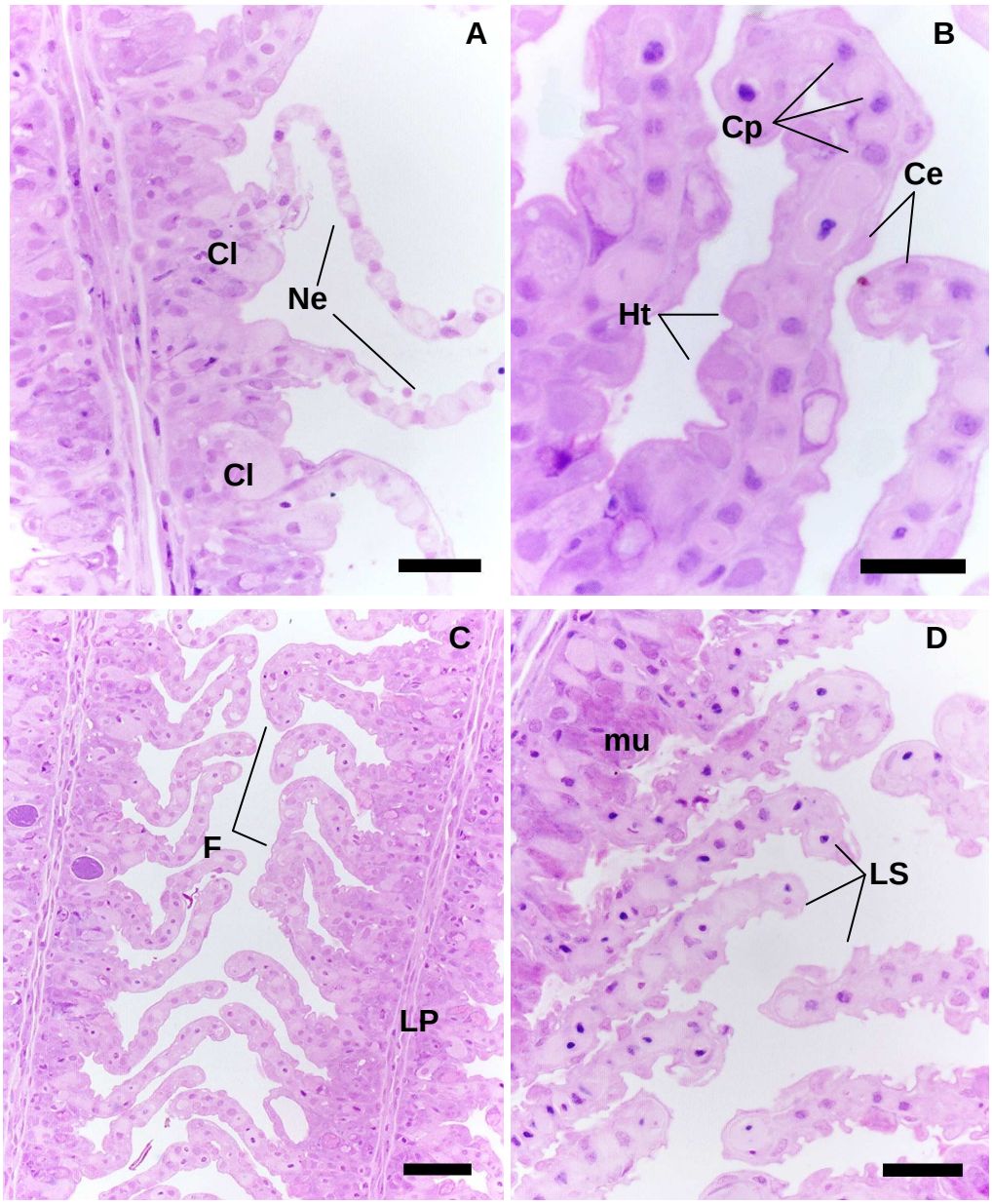
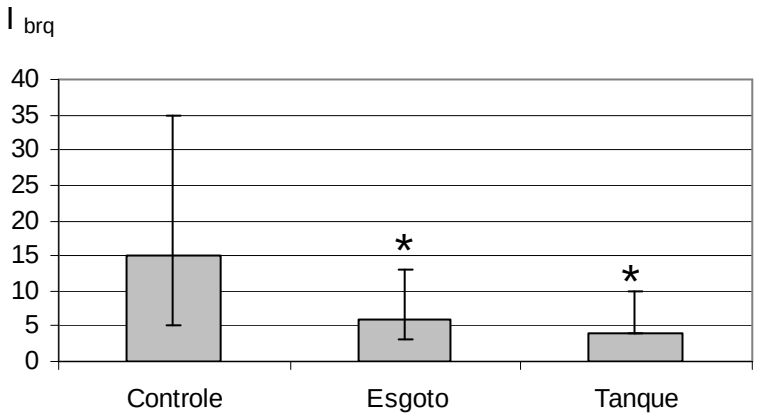


Figura 14. *T. newnesi,* lamelas branquiais, Gaiola III. **A e B.** Grupo controle. **A.** Lamelas secundárias em evidente processo de necrose (Ne). Cl = células de cloreto. Barra = 30 µm. **B.** Hipertrofia (Ht) das células epiteliais da lamela secundária. Cp = células pilares, Ce = células epiteliais normais. Barra = 20 µm. **C.** Grupo Esgoto. Observar a fusão (F) das extremidades das lamelas secundárias. LP = lamela primária. Barra = 50 µm. **D.** Grupo Tanque. Descamação do epitélio das lamelas secundárias (LS). mu = célula mucosa. Barra = 30 µm. Azul de toluidina + fucsina básica.



* p < 0,05

Figura 15. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola III da Operação XXIV.

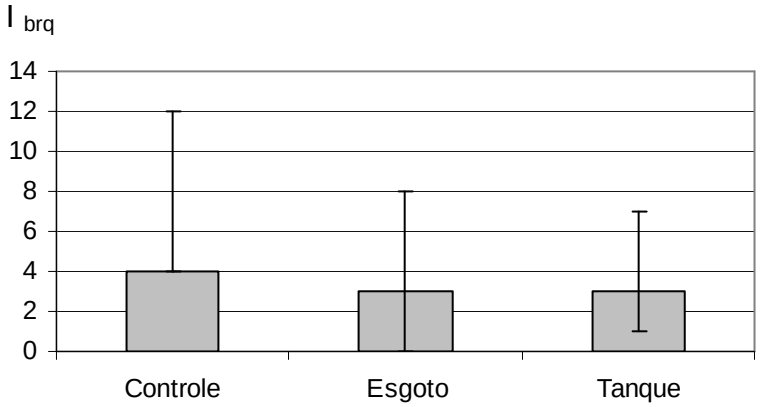


Figura 16. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices da brânquia dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio VI da Operação XXIV.

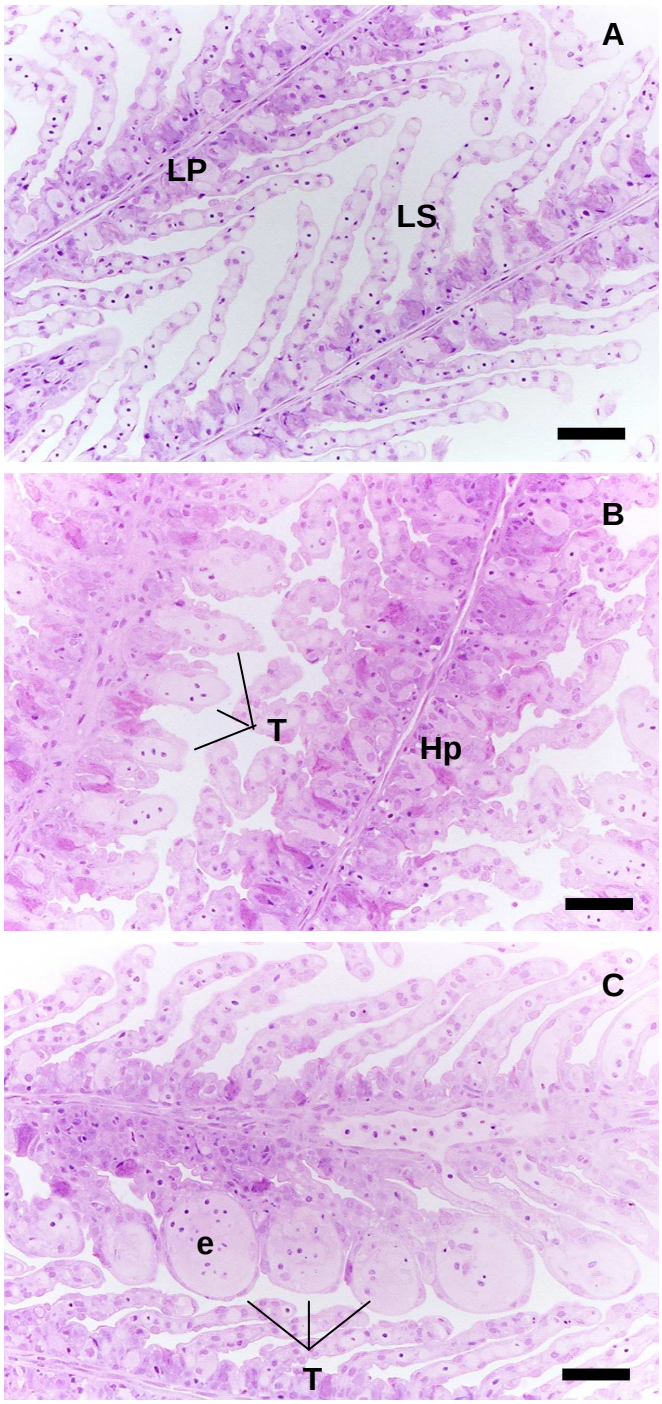


Figura 17. *T. newnesi,* lamelas branquiais, Bioensaio VI. **A.** Grupo controle. Estão presentes lamelas sem alterações. LP = lamela primária, LS = lamela secundária. Barra = 50 µm. **B.** Grupo Esgoto. Observa-se a hiperplasia das células interlamelares (Hp) na lamela primária, bem como a telangiectasia (T) na extremidade das lamelas secundárias. Barra = 50 µm. **C.** Grupo Tanque. Telangiectasia lamelar (T). Notam-se os eritrócitos no interior dos vasos (e). Barra = 50 µm. Azul de toluidina + fucsina básica.

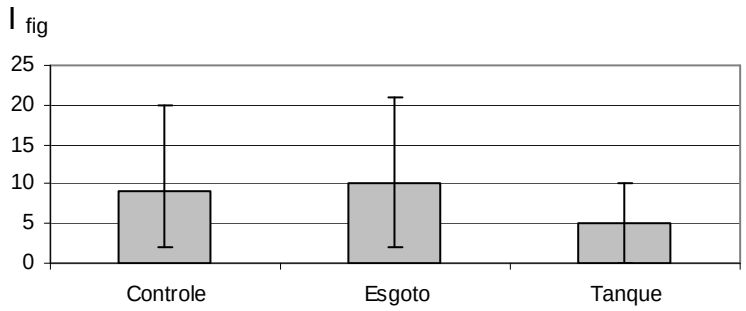


Figura 18. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola I da Operação XXII.

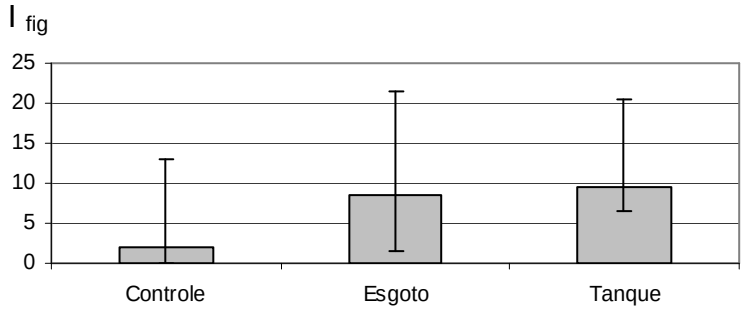


Figura 19. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola II da Operação XXII.

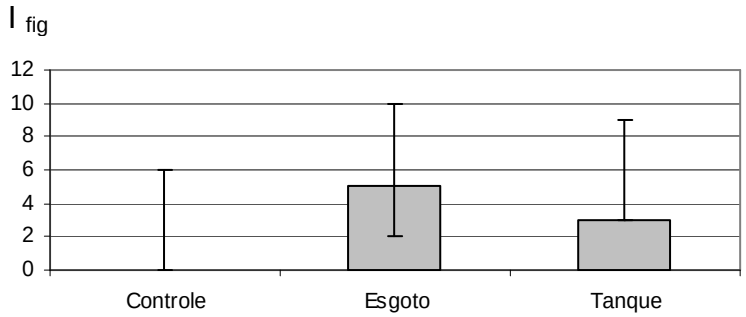


Figura 20. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio I da Operação XXII.

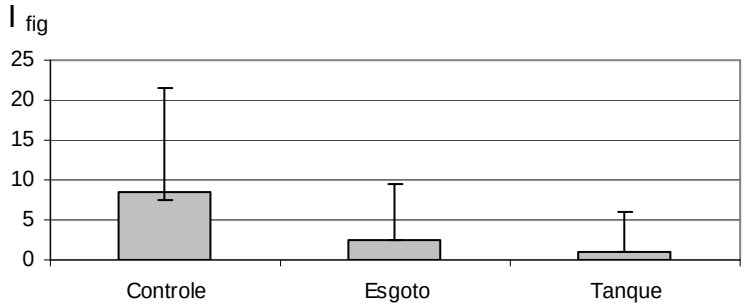


Figura 21. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio III da Operação XXIII.

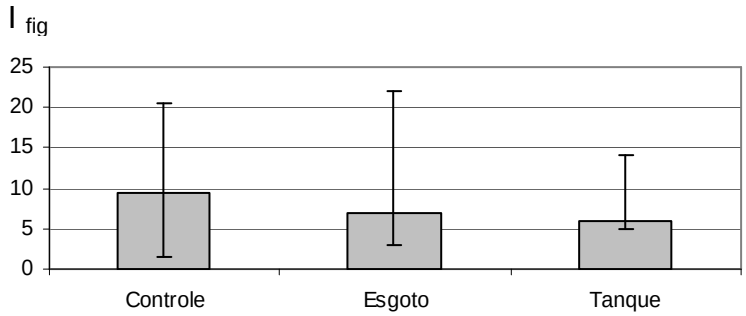
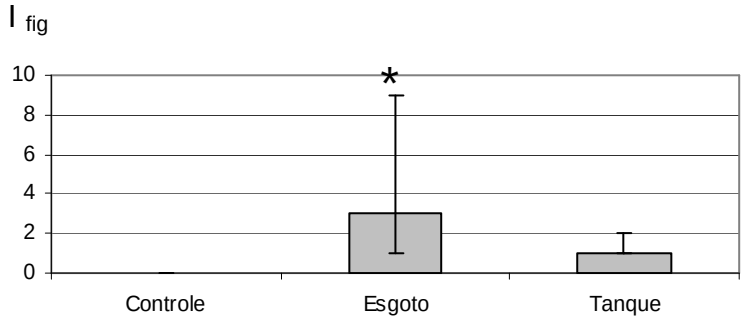


Figura 22. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do experimento Gaiola III da Operação XXIV.



* $p < 0,05$

Figura 23. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio VI da Operação XXIV.

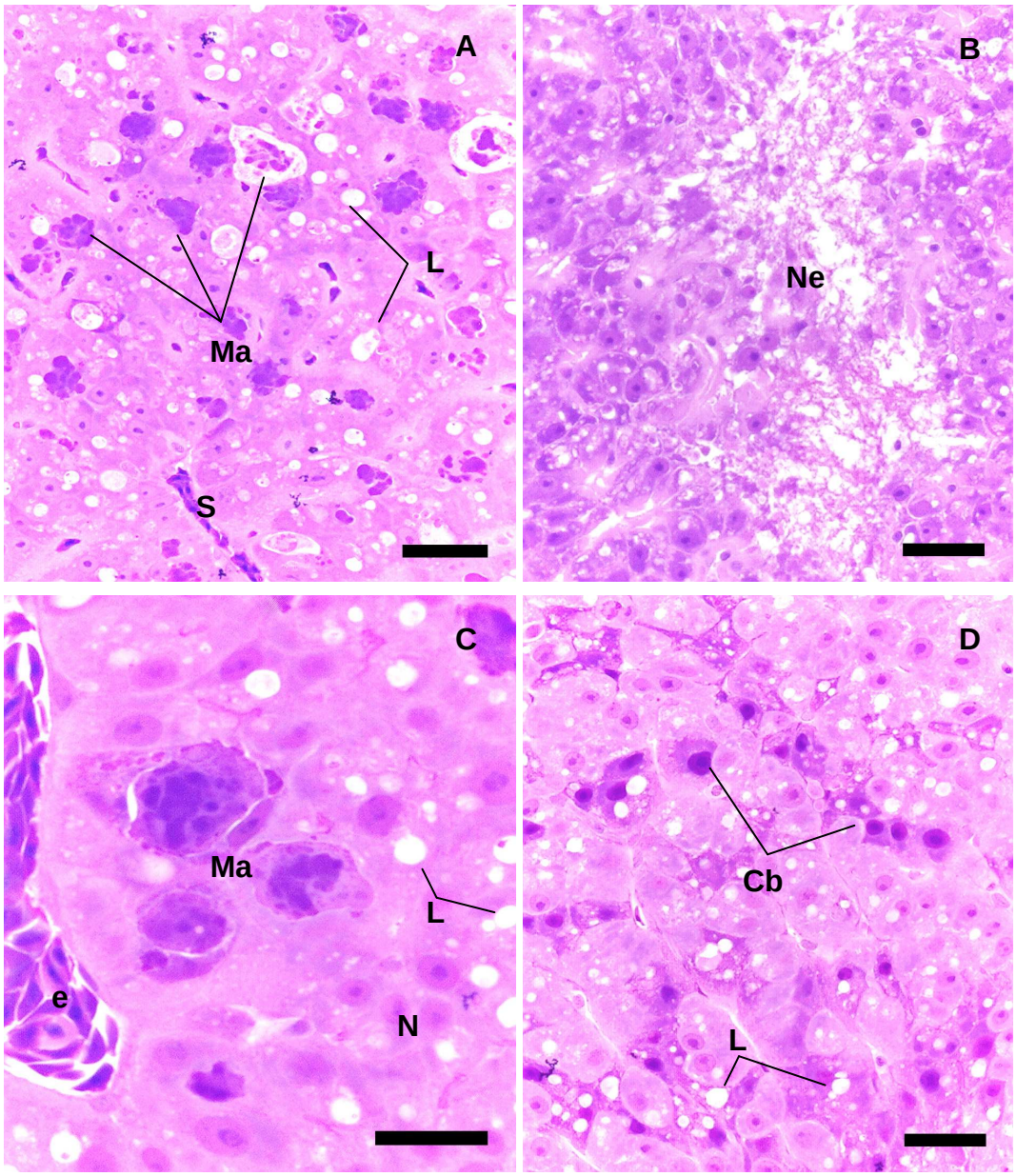


Figura 24. *T. newnesi,* fígado, Gaiola III. **A e B.** Grupo controle. **A.** Nota-se grande quantidade de macrófagos (Ma) dispersos, além de numerosas inclusões lipídicas (L) nas células parenquimais. S = sinusóide. Barra = 30 µm. **B.** Foco de necrose (Ne) no órgão. Barra = 30 µm. **C.** Grupo Esgoto. Detalhe dos macrófagos no interior do órgão, com grandes vesículas digestivas (Ma). L = gotícula lipídica, N = núcleo do hepatócito, e = eritrócito. Barra = 20 µm. **D.** Grupo Tanque. Células basofílicas (Cb) em pequenos agrupamentos no parênquima hepático. Barra = 30 µm. Azul de toluidina + fucsina básica.

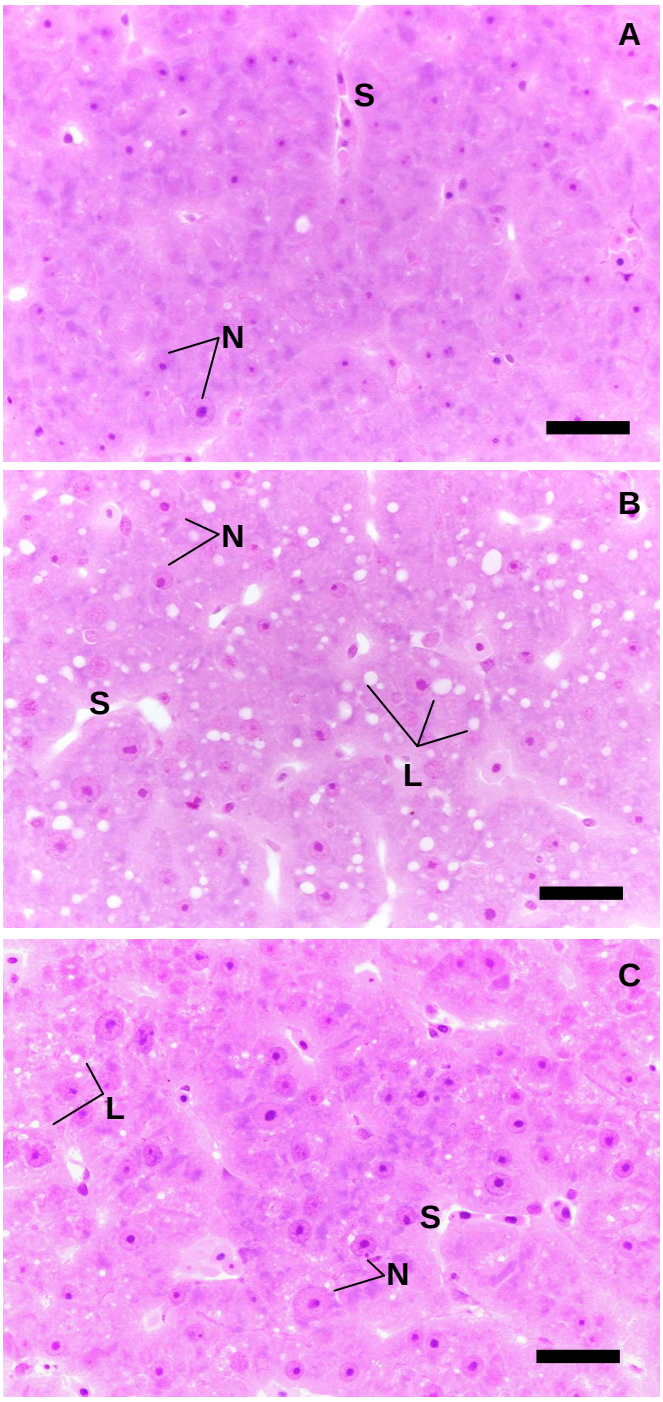


Figura 25. *T. newnesi*, fígado, Bioensaio VI. **A.** Grupo controle. Nestes animais, o parênquima mostrou-se preservado. Barra = 30 µm. **B.** Grupo Esgoto. Parênquima hepático com grande ocorrência de inclusões lipídicas (L). Barra = 30 µm. **C.** Grupo Tanque. Presença de inclusões lipídicas (L) de menor volume e em menor quantidade que na figura anterior. Barra = 30 µm. S = sinusóide, N = núcleo de hepatócito. Azul de toluidina + fucsina básica.

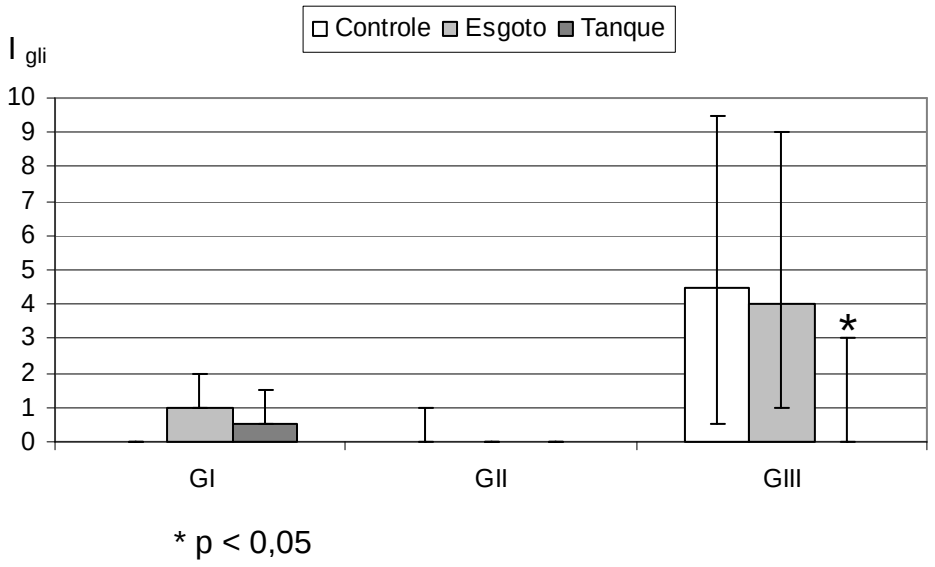


Figura 26. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do glicogênio dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos Gaiola I (GI) e Gaiola II (GII), da Operação XXII e Gaiola III (GIII), da Operação XXIV.

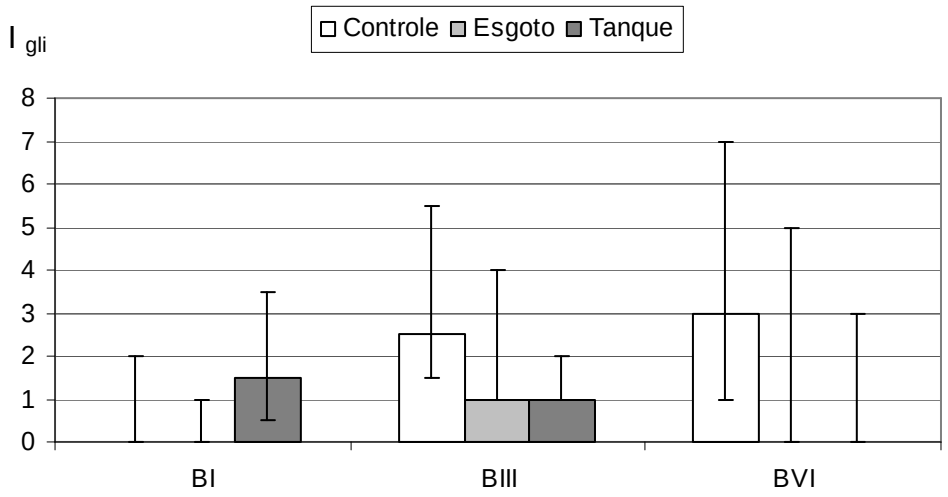


Figura 27. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices do glicogênio dos grupos controle, Esgoto e Tanque do Bioensaio I (BI), da Operação XXII, Bioensaio III (BIII), da Operação XXIII e Bioensaio VI (BVI), da Operação XXIV.

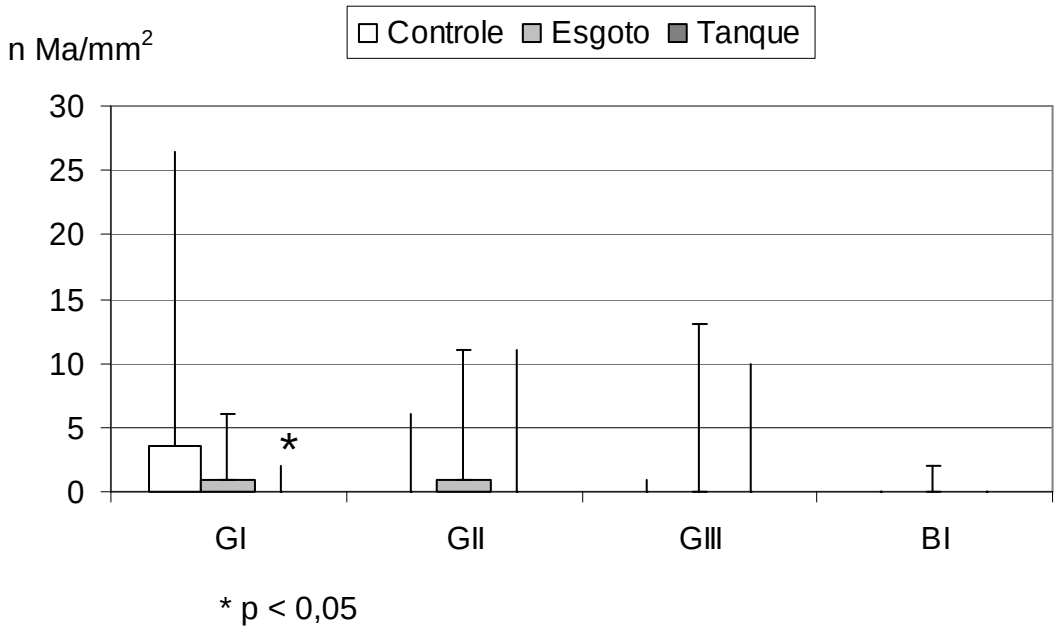


Figura 28. Número de macrófagos (n Ma) no fígado de peixes, *T. newnesi,* no controle e em indivíduos expostos a água do mar diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível nos experimentos Gaiola I (GI) e II (GII) e no Bioensaio I (BI) da Operação XXII e no experimento Gaiola III (GIII) da Operação XXIV.

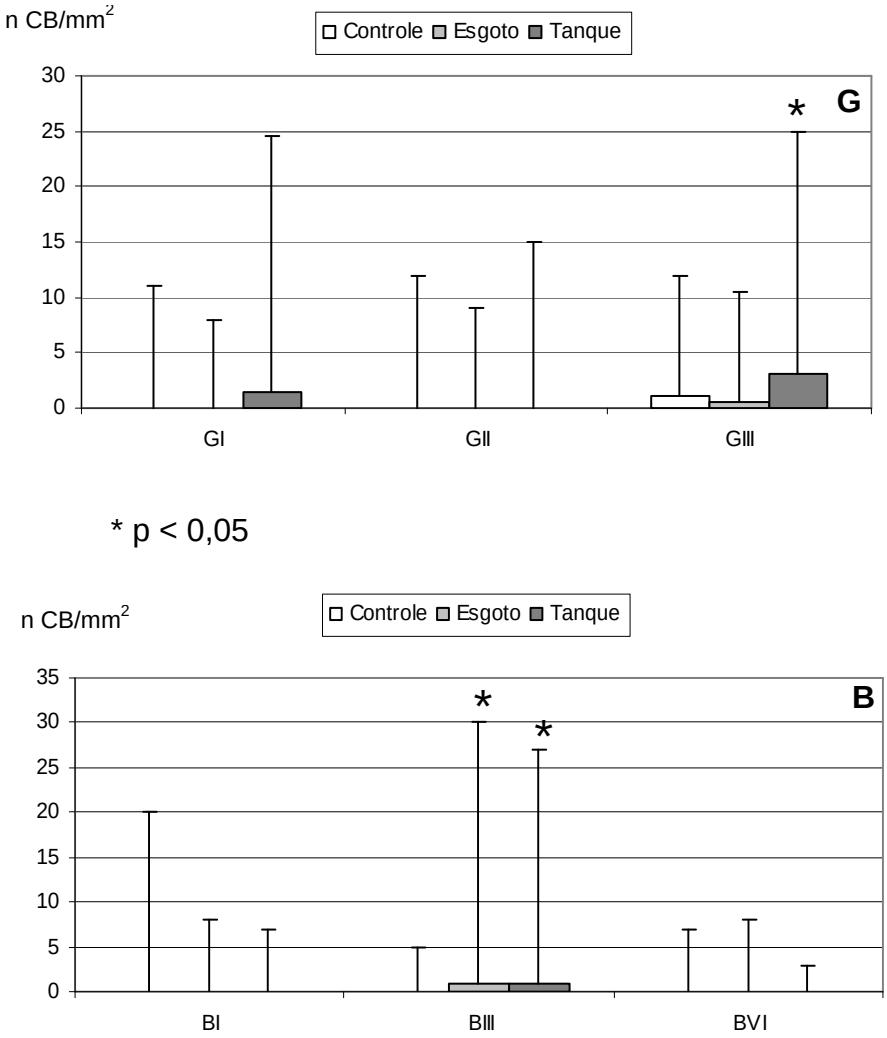


Figura 29. Número de células basofílicas (n CB) no fígado de peixes, *T. newnesi,* no controle e em indivíduos expostos à água do mar diante da saída de esgoto e dos tanques de combustível nos experimentos *in situ* **(G)** GI e GII, da Operação XXII e GIII da Operação XXIV e nos bioensaios **(B)** BI, BIII e BVI, das Operações XXII, XXIII e XXIV, respectivamente.

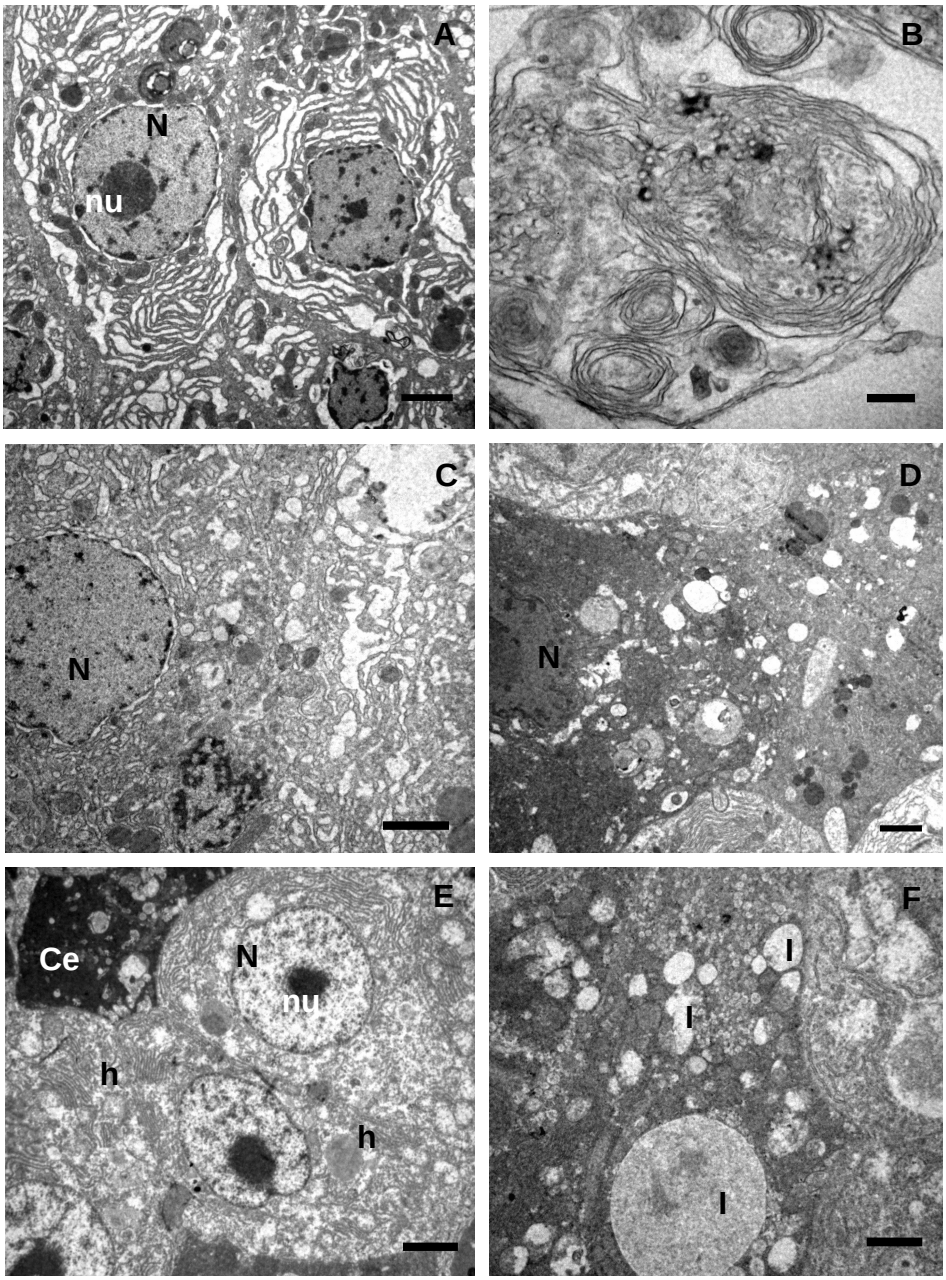


Figura 30. Micrografias eletrônicas de transmissão (MET). *T. newnesi,* fígado, Gaiola III. **A até D.** Grupo controle. **A.** Hepatócito com estrutura citoplasmática perinuclear alterada. N = núcleo, nu = nucléolo. Barra = 2,02 µm. **B.** Macrófago intra-hepático. Detalhe de figuras de mielina em vesícula digestiva. Barra = 314,74 nm. **C.** Hepatócito. Detalhe de célula com ultra-estrutura nuclear e perinuclear normal, mas pode-se observar área citoplasmática à direita da figura com morfologia alterada. Barra = 1,72 µm. **D.** Macrófago intra-hepático. Presença de inclusões citoplasmáticas em vários níveis de eletrondensidade. Barra = 1,71 µm. **E.** Grupo Esgoto. h = hepatócito. Ce = célula eletrondensa. Notar a presença de regiões vacuolares no seu interior. Barra = 3,3 µm **F.** Grupo Tanque. I = inclusões de variada eletrondensidade no citoplasma do hepatócito. Barra = 1,23 µm.

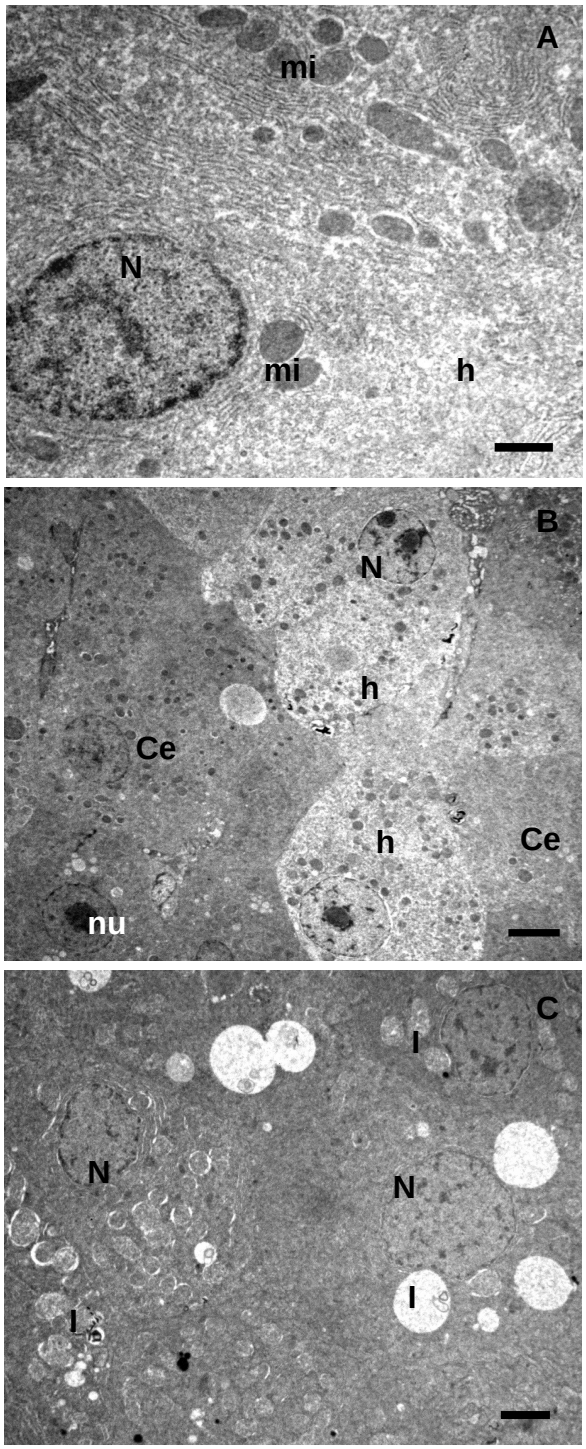


Figura 31. M.E.T. *T. newnesi*, fígado, Bioensaio VI. **A.** Controle. Hepatócito normal (h). mi = mitocôndria, N = núcleo, nu = nucléolo. Barra = 901,71 nm. **B.** Esgoto. N = núcleo, nu = nucléolo, h = hepatócito, Ce = célula eletrondensa. Barra = 3,93 µm. **C.** Tanque. N = núcleo, I = inclusões de variada eletrondensidade no citoplasma do hepatócito. Barra = 2,02 µm.

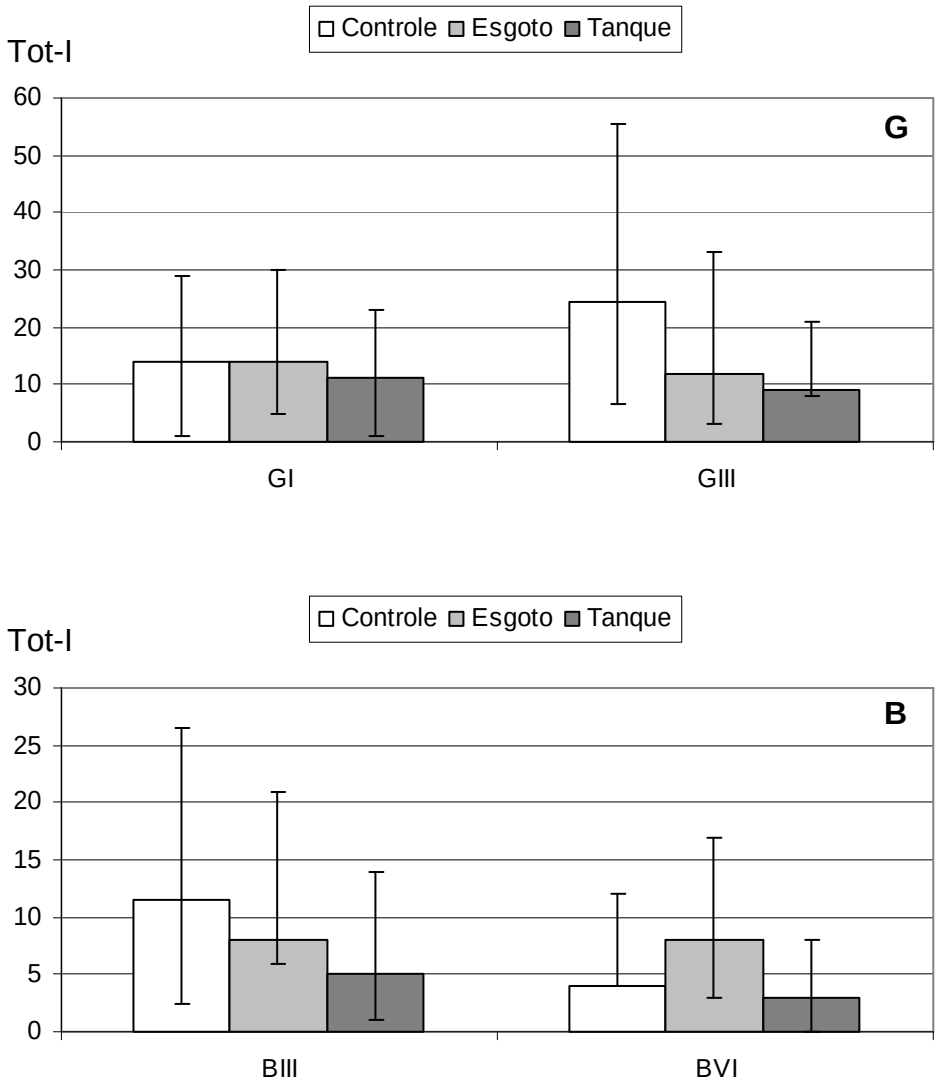


Figura 32. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* (**G**) GI, da Operação XXII, e GIII, da Operação XXIV. Medianas, valores máximos e mínimos dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos bioensaios (**B**) BIII, da Operação XXIII e BVI, da Operação XXIV.

Planilha 1. Alterações branquiais observadas em peixes da espécie *Trematomus newnesi* expostos à água coletada diante da saída de esgoto, dos tanques de armazenamento de combustíveis e controle em água limpa.

Alterações histológicas	w	Ocorrência	Pontuação
1- Distúrbios Circulatórios			
Telangiectasia lamelar	1		
Edema	1		
2- Regressivas			
Alterações estruturais do epitélio:	1		
a) Descamação			
b) Descolamento			
c) Fusão de extremidades de lamelas secundárias			
Alterações na morfologia nuclear	2		
Necrose	3		
3- Progressivas			
Hipertrofia do epitélio	1		
Hiperplasia de células interlamelares	2		
4- Inflamação			
Infiltração de leucócitos no epitélio	2		
5- Tumor			
Benigno	2		
Maligno	3		

Planilha 2. Alterações hepáticas observadas em peixes da espécie *Trematomus newnesi* expostos à água coletada diante da saída de esgoto, dos tanques de armazenamento de combustíveis e controle em água limpa.

Alterações histológicas	w	Ocorrência	Pontuação
1- Distúrbios Circulatórios	1		
a) Hemorragia			
b) Congestão			
2- Regressivas			
Alterações estruturais do epitélio:	1		
a) Desarranjo dos cordões hepáticos			
Alterações do citoplasma	1		
a) Vacuolização lipídica			
b) Grânulos de glicogênio			
Alterações na morfologia nuclear	2		
Necrose	3		
3- Progressivas			
Hipertrofia dos hepatócitos	1		
Hiperplasia dos hepatócitos	2		
4- Inflamação			
a) Ativação do Sistema Retículo Endotelial	1		
b) Infiltração de leucócitos	2		
5- Tumor			
Benigno	2		
Maligno	3		

Tabela 1. Comparação das freqüências de ANE, Mn, L, R e S dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos bioensaios realizados nas Operações XXIII (BII a BV) e XXIV (BVI).

Bioensaios						
	n	**ANE**	**Mn**	**L**	**R**	**S**
Controle BII	5	1.5 ± 0.59	0.8 ± 0.48	0.1 ± 0.11	0.6 ± 0.29	0.1 ± 0.11
Controle BIII	4	2.75 ± 1.91	0.44 ± 0.55	0.5 ± 0.58	1.56 ± 1.48	0. 25 ± 0.35
Controle BIV	3	1.67 ± 0.95	0.00	0.17 ± 0.29	1.42 ± 0.72	0.08 ± 0 .14
Controle BV	3	2.75 ± 0.66	0.17 ± 0.29	0.75 ± 0.5	1.83 ± 0.63	0. 00
Controle BVI	3	4 ± 3.68	0.42 ± 0.72	0.33 ± 0.38	3.25 ± 3.19	0.00
Esgoto BII	5	1.7 ± 1.07	0.7 ± 0.33 ^{a,d}	0.2 ± 0.21	0.75 ± 0.64	0.05 ± 0.11
Esgoto BIII	4	1.13 ± 0.63	0.44 ± 0.43 ^{a,b,c,d}	0.06 ± 0.13	0.63 ± 0.32	0.00
Esgoto BIV	3	1.67 ± 0.88	0.08 ± 0.14 ^{b,d}	0.33 ± 0.38	1.25 ± 0.43	0.00
Esgoto BV	3	2.67 ± 2.02	0.00 ^{b,c}	0.33 ± 0.29	2.33 ± 1.76	0.00
Esgoto BVI	3	8.75 ± 6.96	0.33 ± 0.14 ^{d}	1.67 ± 1.59	6.5 ± 5.13	0.25 ± 0.43
Tanque BII	5	1.3 ± 0.72	0.5 ± 0.43 ^{e,g}	0.2 ± 0.21	0.45 ± 0.51	0.15 ± 0.22
Tanque BIII	4	2.88 ± 1.76	0.75 ± 0.35 ^{g}	0.56 ± 0.24	1.31 ± 1.11	0.25 ± 0.35
Tanque BIV	2	2.13 ± 2.65	0.00 ^{f,g}	0.25 ± 0.35	1.5 ± 1.77	0.38 ± 0.53
Tanque BV	3	2.17 ± 0.52	0.00 f^{,h}	0.58 ± 0.58	1.58 ± 0.14	0.00
Tanque BVI	3	3.58 ± 1.26	0.17 ± 0.29 ^{e,f,g,h}	0.5 ± 0.25	2.92 ± 1.46	0.00

Média ± Desvio padrão
BII = Bioensaio II
BIII = Bioensaio III
BIV = Bioensaio IV
BV = Bioensaio V
BVI = Bioensaio VI
Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Tabela 2. Comparação das freqüências de ANE, Mn, L, R e S dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos experimentos *in situ* realizados na Operação XXIV.

Gaiolas						
	n	**ANE**	**Mn**	**L**	**R**	**S**
Controle GIII	2	2.88 ± 1.59	0.38 ± 0.18	0.38 ± 0.18	2 ± 1.41	0.13 ± 0.18
Controle GIV	5	4.95 ± 1.5	0.15 ± 0.22	0.55 ± 0.41	4.25 ± 1.53	0. 00
Esgoto GIII	5	1.8 ± 1.11	0.2 ± 0.45	0.5 ± 0.53	1 ± 0.88	0.1 ± 0 .22
Esgoto GIV	5	5.75 ± 4.18	0.15 ± 0.22	1.3 ± 1.36	4 ± 2.69	0.1 ± 0.14
Tanque GIII	5	0.75 ± 0.56 [a]	0.1 ± 0.22	0.05 ± 0.11	0.5 ± 0.59 [c]	0.1 ± 0.14
Tanque GIV	5	5.65 ± 3.47 [b]	0.3 ± 0.11	0.55 ± 0.74	4.7 ± 2.78 [d]	0.05 ± 0.11

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
GIII = Gaiola III
GIV = Gaiola IV
Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Tabela 3. Alterações histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* dos grupos controle e dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e da frente dos tanques de combustível.

	Gaiola I			**Gaiola II**			**Bioensaio I**		
Brânquias	**C**	**E**	**T**	**C**	**E**	**T**	**C**	**E**	**T**
Telangiectasia	0(2)	2(3)	1(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Edema	0(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Descamação	0(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Descolamento	1(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Fusão da extremidade das lamelas secundárias	0(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Necrose	0(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Hipertrofia	2(2)	3(3)	2(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Hiperplasia	0(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Infiltração de leucócitos	0(2)	0(3)	0(2)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Fígado									
Congestão	2(2)	2(3)	0(2)	1(3)	0(4)	2(4)	0(3)	0(3)	0(2)
Vacuolização lipídica	2(2)	3(3)	2(2)	3(3)	4(4)	4(4)	1(3)	3(3)	1(2)
Alteração da morfologia nuclear	1(2)	1(3)	1(2)	0(3)	4(4)	2(4)	0(3)	0(3)	0(2)
Necrose	0(2)	1(3)	0(2)	0(3)	0(4)	0(4)	0(3)	0(3)	0(2)
Macrófagos	1(2)	3(3)	1(2)	3(3)	4(4)	3(4)	0(3)	1(3)	0(2)
Células basofílicas	2(2)	2(3)	2(2)	3(3)	4(4)	3(4)	3(3)	2(3)	2(2)

C = Grupo Controle
E = Grupo Esgoto
T = Grupo Tanque
(n) = número de indivíduos amostrados
Na = não analisado

Tabela 4. Alterações histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* dos grupos controle e dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e da frente dos tanques de combustível.

	Bioensaio III			**Bioensaio IV**			**Bioensaio V**		
Brânquias	**C**	**E**	**T**	**C**	**E**	**T**	**C**	**E**	**T**
Telangiectasia	2(4)	3(4)	0(4)	3(3)	3(3)	2(2)	1(3)	2(3)	2(3)
Edema	0(4)	0(4)	0(4)	0(3)	0(3)	0(2)	0(3)	1(3)	1(3)
Descamação	4(4)	1(4)	4(4)	3(3)	1(3)	2(2)	1(3)	1(3)	2(3)
Descolamento	0(4)	2(4)	1(4)	0(3)	0(3)	0(2)	1(3)	0(3)	2(3)
Fusão da extremidade das lamelas secundárias	0(4)	0(4)	1(4)	0(3)	1(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(3)
Necrose	0(4)	0(4)	0(4)	0(3)	0(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(3)
Hipertrofia	2(4)	4(4)	4(4)	2(3)	0(3)	1(2)	0(3)	0(3)	0(3)
Hiperplasia	0(4)	0(4)	0(4)	0(3)	0(3)	0(2)	0(3)	0(3)	0(3)
Infiltração de leucócitos	0(4)	0(4)	0(4)	0(3)	0(3)	0(2)	0(3)	1(3)	1(3)
Fígado									
Congestão	0(4)	1(4)	1(3)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Vacuolização lipídica	4(4)	3(4)	2(3)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Alteração da morfologia nuclear	3(4)	0(4)	0(3)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Necrose	3(4)	0(4)	0(3)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Macrófagos	0(4)	0(4)	0(3)	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Células basofílicas	4(4)	4(4)	3(3)	Na	Na	Na	Na	Na	Na

C = Grupo Controle
E = Grupo Esgoto
T = Grupo Tanque
(n) = número de indivíduos amostrados
Na = não analisado

Tabela 5. Alterações histopatológicas observadas nas brânquias e fígado de *T. newnesi* dos grupos controle e dos grupos expostos à água coletada diante da saída de esgoto e da frente dos tanques de combustível.

	Gaiola III			**Bioensaio VI**		
Brânquias	**C**	**E**	**T**	**C**	**E**	**T**
Telangiectasia	1(2)	0(5)	2(5)	0(2)	1(3)	2(3)
Edema	0(2)	0(5)	0(5)	0(2)	0(3)	0(3)
Descamação	1(2)	0(5)	1(5)	0(2)	1(3)	1(3)
Descolamento	2(2)	4(5)	0(5)	0(2)	0(3)	0(3)
Fusão da extremidade das lamelas secundárias	0(2)	2(5)	1(5)	1(2)	0(3)	0(3)
Necrose	2(2)	1(5)	0(5)	0(2)	0(3)	0(3)
Hipertrofia	2(2)	4(5)	4(5)	0(2)	3(3)	2(3)
Hiperplasia	1(2)	3(5)	1(5)	1(2)	0(3)	1(3)
Infiltração de leucócitos	0(2)	0(5)	0(5)	0(2)	0(3)	0(3)
Fígado						
Congestão	0(2)	1(4)	0(5)	0(3)	1(3)	0(3)
Vacuolização lipídica	2(2)	4(4)	5(5)	0(3)	3(3)	2(3)
Alteração da morfologia nuclear	1(2)	2(4)	1(5)	0(3)	0(3)	0(3)
Necrose	1(2)	1(4)	0(5)	0(3)	0(3)	0(3)
Macrófagos	2(2)	2(4)	4(5)	0(3)	0(3)	0(3)
Células basofílicas	2(2)	4(4)	5(5)	3(3)	2(3)	1(3)

C = Grupo Controle
E = Grupo Esgoto
T = Grupo Tanque
(n) = número de indivíduos amostrados

Tabela 6. Comparação interanual dos Índices da brânquia dos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI) e XXIV (GIII).

Gaiolas		
	n	**Índice da brânquia**
Controle GI	2	5 ± 1.41
Controle GIII	2	15 ± 7.07
Esgoto GI	3	4 ± 2.65
Esgoto GIII	5	5.4 ± 1.52
Tanque GI	2	6 ± 1.41
Tanque GIII	5	3 ± 2.45

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
GI = Gaiola I
GIII = Gaiola III

Tabela 7. Comparação interanual dos Índices da brânquia dos bioensaios realizados nas Operações XXIII (BIII a BV) e XXIV (BVI).

Bioensaios		
	n	**Índice da brânquia**
Controle BIII	4	4 ± 3.16
Controle BIV	3	5 ± 2
Controle BV	3	1.67 ± 1.53
Controle BVI	2	4 ± 5.66
Esgoto BIII	4	4.75 ± 3.77
Esgoto BIV	3	4 ± 1
Esgoto BV	3	3 ± 1.73
Esgoto BVI	3	3.67 ± 1.15
Tanque BIII	4	3.75 ± 0.5
Tanque BIV	2	3 ± 1.4
Tanque BV	3	3.33 ± 1.53
Tanque BVI	3	3 ± 1

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
BIII = Bioensaio III
BIV = Bioensaio IV
BV = Bioensaio V
BVI = Bioensaio VI

Tabela 8. Comparação interanual dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI e GII) e XXIV (GIII).

Gaiolas		
	n	**Índice do fígado**
Controle GI	2	9 ± 2.83
Controle GII	3	5 ± 5.2
Controle GIII	2	9.5 ± 2.12
Esgoto GI	3	9.67 ± 1.53
Esgoto GII	4	9.25 ± 2.63
Esgoto GIII	4	8.25 ± 4.79
Tanque GI	2	5 ± 0
Tanque GII	4	8.25 ± 3.77
Tanque GIII	5	5.6 ± 2.88

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
GI = Gaiola I
GII = Gaiola II
GIII = Gaiola III

Tabela 9. Comparação interanual dos Índices do fígado dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos bioensaios realizados nas Operações XXII (BI), XIII (BIII) e XXIV (BVI).

Bioensaios		
	n	**Índice do fígado**
Controle BI	3	2 ± 3.46 [a,b]
Controle BIII	4	7.75 ± 5.38 [a]
Controle BVI	3	0 ± 0 [b]
Esgoto BI	3	4.33 ± 1.15
Esgoto BIII	4	3 ± 2.94
Esgoto BVI	3	3.67 ± 2.08
Tanque BI	2	3 ± 4.24
Tanque BIII	3	2 ± 2.65
Tanque BVI	3	0.67 ± 0.58

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
BI = Bioensaio I
BIII = Bioensaio III
BVI = Bioensaio VI
Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Tabela 10. Comparação interanual da quantidade de macrófagos dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* das Operações XXII (GI e GII) e XXIV (GIII).

Gaiolas	**n**	**n MA**
Controle GI	30	6.3 ± 7 [a]
Controle GII	45	1.31 ± 2.02 [a,b]
Controle GIII	30	0.1 ± 0.31 [b]
Esgoto GI	45	1.2 ± 1.25 [c,d]
Esgoto GII	60	2.12 ± 2.58 [c]
Esgoto GIII	60	0.95 ± 2.18 [d]
Tanque GI	30	0.57 ± 0.77
Tanque GII	60	1.68 ± 2.27
Tanque GIII	75	1.08 ± 2.05

Média ± Desvio padrão
n = número de campos microscópicos analisados em aumento de 40x
n Ma = número de macrófagos por mm^2
GI = Gaiola I
GII = Gaiola II
GIII = Gaiola III
Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Tabela 11. Comparação interanual da quantidade de células basófilas dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos bioensaios realizados nas Operações XXII (BI), XXIII (BIII) e XXIV (BVI).

Bioensaios	**n**	**n CB**
Controle BI	45	2.18 ± 4.39
Controle BIII	60	0.68 ± 1.27
Controle BVI	45	1 ± 1.97
Esgoto BI	45	0.6 ± 1.75 [a]
Esgoto BIII	60	2.7 ± 5.02 [b]
Esgoto BVI	45	0.98 ± 1.96 [a,b]
Tanque BI	30	1.33 ± 2.01 [c,e]
Tanque BIII	45	3.42 ± 5.57 [d]
Tanque BVI	45	0.16 ± 0.52 [e]

Média ± Desvio padrão
n = número de campos microscópicos analisados em aumento de 40x
n CB = número de células basofílicas por mm^2
BI = Bioensaio I
BIII = Bioensaio III
BVI = Bioensaio VI
Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Tabela 12. Comparação interanual da quantidade de células basófilas dos grupos controle, Esgoto e Tanque nos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI e GII) e XXIV (GIII).

Gaiolas	**n**	**n CB**
Controle GI	30	1.37 ± 2.83
Controle GII	45	1.02 ± 2.11
Controle GIII	30	2.27 ± 2.82
Esgoto GI	45	1.29 ± 2.21 [a,b]
Esgoto GII	60	0.72 ± 1.71 [a]
Esgoto GIII	60	1.8 ± 2.46 [b]
Tanque GI	30	4.69 ± 6.61 [c,e]
Tanque GII	60	0.78 ± 2.73 [d]
Tanque GIII	75	4.71 ± 5.37 [e]

Média ± Desvio padrão
n = número de campos microscópicos analisados em aumento de 40x
n CB = número de células basofílicas por mm^2
GI = Gaiola I
GII = Gaiola II
GIII = Gaiola III
Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$)

Tabela 13. Comparação interanual dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos experimentos *in situ* realizados nas Operações XXII (GI) e XXIV (GIII).

Gaiolas		
	n	**Índice total**
Controle GI	2	14 ± 1.41
Controle GIII	2	24.5 ± 9.19
Esgoto GI	3	13 ± 3.61
Esgoto GIII	4	13.5 ± 5.74
Tanque GI	2	11 ± 1.41
Tanque GIII	5	8.6 ± 4.51

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
GI = Gaiola I
GIII = Gaiola III

Tabela 14. Comparação interanual dos Índices totais dos grupos controle, Esgoto e Tanque dos bioensaios realizados nas Operações XXIII (BIII) e XXIV (BVI).

Bioensaios		
	n	**Índice total**
Controle BIII	4	11.75 ± 2.5
Controle BVI	2	4 ± 5.66
Esgoto BIII	4	7.75 ± 4.57
Esgoto BVI	3	7.33 ± 2.08
Tanque BIII	3	6 ± 2.65
Tanque BVI	3	3.67 ± 1.15

Média ± Desvio padrão
n = número de peixes
BIII = Bioensaio III
BVI = Bioensaio VI