Alfonso Braga Bartolini Salimbeni Vivai

Efeitos da fração solúvel de petróleo (FSA) no peixe antártico

***Trematomus newnesi* (Boulenger, 1902)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em ciências (Biologia Celular e Tecidual).

São Paulo
2011

Alfonso Braga Bartolini Salimbeni Vivai

**Efeitos da fração solúvel de petróleo (FSA) no peixe antártico
Trematomus newnesi (Boulenger, 1902)**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em ciências (Biologia Celular e Tecidual).

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva.

Versão Original.

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Vivai, Alfonso Braga Bartolini Salimbeni.

Efeitos da fração solúvel de petróleo (FSA) no peixe antártico
Trematomus newnesi (Boulenger, 1902) / Alfonso Braga Bartolini
Salimbeni Vivai. -- São Paulo, 2011.

Orientador: José Roberto Machado Cunha da Silva.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do
Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual.
Linha de pesquisa: Histologia aplicada.

Versão do título para o inglês: Effect of petroleum water soluble
fraction WSF on antarctic fish *Trematomus newnesi* (Boulenger, 1902)

Descritores: 1. FSA 2. Biomarcadores 3. Histologia animal 4.
Petróleo I. Silva, José Roberto Machado Cunha da II. Universidade
de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB0217/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alfonso Braga Bartolini Salimbeni Vivai.

Título da Dissertação: Efeitos da fração solúvel de petróleo (FSA) no peixe
antártico *Trematomus newnesi* (Boulenger, 1902).

Orientador(a): José Roberto Machado Cunha da Silva.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
 Nome completo:
 Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
 Nome completo:
 Instituição:

Presidente: Assinatura:
 Nome completo:
 Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **009** nas fls. **98** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **José Roberto Machado Cunha da Silva**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Possível uso das células de bastonetes (Rodlet Cells) como biomarcadores para poluição causada por fração solúvel do petróleo (FSA) em brânquias do peixe antártico Trematomus newnesi (Boulenger, 1902)"* do qual participam o(s) alunos **Paola Cristina Branco, Alfonso Braga Bartolini Salimbeni Vivai e o pesquisador João Carlos Shimada Borges**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **15.02.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 17 de fevereiro de 2011.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

Aos meus colegas de laboratório, amigos e familiares (especialmente meus pais) pelo apoio. A Deus.
À Emília Ribeiro,

Dedico!

AGRADECIMENTO

Ao Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva pela orientação, presença, confiança e ensino... por muitos anos que se foram e pelos que não de vir.

Aos técnicos Emília Ribeiro e Gaspar Ferreira de Lima, em toda a sua sabedoria laboratorial e de vivência.

Aos meus colegas de laboratório pelo suporte nos caminhos empíricos.

Ao Dr. João Carlos Shimada Borges e doutoranda Paola Cristina Branco pelo manejo do material quando de suas presenças no continente antártico e pelo suporte teórico.

Aos pesquisadores do Instituto Oceanográfico, pelo apoio dado em questões práticas e na avaliação do teste de micronúcleo e de outras anomalias eritrocitárias.

À SECIRM (Secretaria Interministerial para os Recursos do Mar) pelo apoio logístico à gélida Antártica.

À Marinha do Brasil pelo apoio logístico.

À Petrobrás por ceder o óleo Albacora nº1.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para a expedição antártica.

Ao Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de desenvolver o projeto e a todos os professores pela ajuda indispensável.

Nada seria possível sem os tortuosos caminhos da burocracia, nos quais as secretárias do departamento são verdadeiras mestras: eis, então, que devo meus agradecimentos a essas mulheres.

Na Qualificação, os conselhos dos professores Phan Van Gnan, Marília Cerqueira Leite Seelaender e Chao Yun Irene Yan foram e inestimável valia. A eles, meus agradecimentos.

Ao professor Francisco Javier Hernandez-Blazquez, por disponibilizar o fotomicroscópio do Laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária da USP, para a obtenção de algumas imagens concernentes a esse trabalho.

Trabalhos com biomarcadores vêm para demonstrar perturbações no ambiente. Neste caso, se alguns navios não tivessem sofrido seus acidentes e a Guerra Fria não tivesse feito alguns países estocarem petróleo na Antártica, o presente trabalho não teria este rico objeto de estudo: o ouro negro aplicado a um espécime tão singular. Este trabalho agradece à Guerra Fria e aos navios acidentados.

Aos meus pais: são eles quem me acolhem no melhor (e no pior) da vida.

Aos meus amigos: da Universidade de São Paulo e fora dela.

Em especial, à D. Gemma Bertoldo, minha professora de piano, que foi convocada este ano para dar lições de música aos anjos.

“A LIMITAÇÃO DA RAZÃO EM
ATINGIR AS ESSÊNCIAS E AS PRI-
MEIRAS CAUSAS TORNA PRATI-
CAMENTE ILIMITADA AS POSSIBI-
LIDADES DA PESQUISA EMPÍRI-
CA.”

(MAURÍCIO DE CARVALHO
RAMOS)¹

¹ In: A geração dos corpos organizados em Malpertuis. 2009.

RESUMO

VIVAI, A. B. B. S. **Efeitos da fração solúvel de petróleo (FSA) no peixe antártico *Trematomus newnesi* (Boulenger, 1902).** 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Derramamento de petróleo tem sido um evento comum em atividades marítimas ao redor do mundo. O ambiente antártico, no entanto, é considerado não poluído ou menos poluído quando comparado a outros ambientes. A fração solúvel de petróleo (FSA) é mais danosa do que o derrame por si mesmo, então o uso de biomarcadores celulares para esse tipo de poluição é extremamente útil para avaliar os efeitos de pequenos níveis de poluição por petróleo no ambiente antártico. O presente trabalho teve como objetivo estudar, com microscopia de luz e eletrônica de transmissão, biomarcadores histológicos (Índice de Alterações Histológicas de brânquias e fígado, Valor Médio de Avaliação para brânquias e fígado, teste do micronúcleo em eritrócitos e rodlet cells - células de bastonetes - como um possível biomarcador) para poluição por petróleo no peixe antártico *Trematomus newnesi* expostos a diferentes concentrações de FSA (0; 0,4; 0,8 ppm) por 5, 10 e 15 dias. Alterações em análises hematológicas foram observadas em 15 dias no peixe controle (0 ppm de FSA), enquanto a histologia dos órgãos e a quantidade de células de bastonetes não revelou nenhuma alteração estatisticamente significativa. Esta foi a primeira vez que o efeito deste tipo de poluição foi estudado utilizando-se o peixe antártico *Trematomus newnesi* como um possível bioindicador.

Palavras-chave: FSA. Biomarcadores. Alterações Histológicas. Peixe.

ABSTRACT

VIVAI, A. B. B. S. **Effect of petroleum water soluble fraction WSF on Antarctic fish *Trematomus newnesi* (Boulenger, 1902)**. 2011. 80p. Master thesis (Cell biology and Tissue) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

Oil spill and other pollutants have been a common event in shipping all over the world. Antarctic environment however is known as unpolluted or less polluted when compared to others. The water soluble fraction of oil (WSF) is more dangerous for marine species than the oil spill itself, thus the use of cellular biomarkers for this type of pollution is extremely useful to evaluate the effects of small levels of oil pollution in Antarctic environment. The present work aimed to study, with light microscopy and electronic transmission microscopy, histologic biomarkers (Histologic Alterations Index for gills and liver, Average Evaluation Value for both gills and liver, micronucleous test in erythrocytes, besides rodlet cells for a possible biomarker) for oil pollution in the Antarctic fish *Trematomus newnesi* exposed to different concentrations of WSF (0; 0.4; 0.8 ppm) for 5, 10 and 15 days. Alterations in hematological analysis was observed in 15 days control fish (0 ppm of WSF), whereas the organs histology and RC amount did not reveal any significant statistical alterations. This was the very first time that the effect of oil pollution was studied using the Antarctic fish *Trematomus newnesi* as a possible biomarker.

Key words: WSF. Biomarkers. Histological changes. Fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Local onde se encontra a Estação Antártica Comandante Ferraz.....	32
Figura 2: Dispositivo utilizado para a confecção da fração solúvel do petróleo.....	34
Figura 3: Esquema explicativo da montagem dos tanques de manejo.....	35
Figura 4: Medição do comprimento total e comprimento padrão em <i>Trematomus newnesi</i>	36
Figura 5: Média da contagem de células de bastonetes.....	47
Figura 6: Corte histológico em historesina de uma lamela primária de <i>T. newnesi</i>	47
Figura 7: Corte histológico em historesina de uma lamela primária de <i>T. newnesi</i>	48
Figura 8: Corte em historesina mostrando de duas lamelas secundárias projetando-se a partir de uma lamela primária.....	48
Figura 9: Eletron-micrografias de transmissão de lamelas secundárias das brânquias de <i>T.newnesi</i> expostos a 20% de FSA.....	49
Figura 10: Médias dos Índices de Alterações Histológicas encontrados nas brânquias de <i>T. newnesi</i> expostos às diferentes concentrações de FSA.....	50
Figura 11: Valor médio de Avaliação (VMA) das brânquias de peixes antárticos <i>T. newnesi</i> expostos a diferentes concentrações de FSA.....	51
Figura 12 Fotomicrografias de cortes histológicos de brânquias de <i>T. newnesi</i> em historesina.....	52
Figura 13: Eletron-micrografia de transmissão de uma lamela secundária da brânquia de <i>T.newnesi</i>	53
Figura 14: Eletron-micrografia de transmissão de uma lamela secundária da brânquia de <i>T.newnesi</i>	53

Figura 15: Médias do Índice de alterações histológicas e desvio padrão do fígado dos peixes <i>T. newnesi</i> expostos a diferentes concentrações de FSA.....	54
Figura 16: Valor Médio de Avaliação (VMA) e desvio padrão do fígado dos peixes antárticos <i>T. newnesi</i> expostos a diferentes concentrações de FSA	55
Figura 17: Fotomicrografias ao microscópio de luz de cortes de fígado em historesina.....	55
Figura 18: Frequência de células com micronúcleo, núcleos lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidade nucleares eritrocitárias totais.....	58
Figura 19: Frequência de células com micronúcleo, núcleos lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidade nucleares eritrocitárias totais.....	58
Figura 20: Frequência de células com micronúcleo, núcleos lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidade nucleares eritrocitárias totais.....	59
Figura 21 Frequência de células com micronúcleo, núcleos lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidade nucleares eritrocitárias totais.....	59
Figura 22: Frequência de células com micronúcleo núcleos lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidade nucleares eritrocitárias totais.....	60
Figura 23: Frequência de células com micronúcleo, núcleos lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidade nucleares eritrocitárias totais.....	60
Figura 24: Fotomicrografia de luz de extensão sanguínea mostrando eritrócitos de <i>Trematomus newnesi</i> com núcleo normal (A), micronúcleo (B), núcleo lobado (C), núcleo segmentado (D) e núcleo reniforme (E).....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Alterações na estrutura branquial passíveis de observação e notação segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic.....	39
Tabela 2: Correlação dos valores de I e os efeitos na brânquia segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic.....	40
Tabela 3: Alterações na estrutura hepática passíveis de observação e registro segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic.....	41
Tabela 4: Correlação dos valores de I e os efeitos no fígado segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic:.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IAH – Índice de Alterações Histológicas

VMA – Valor Médio de Avaliação

Mn – Micronúcleo

L – Núcleo Lobado

S – Núcleo Segmentado

K – Núcleo Reniforme

ENA – Anormalidades Eritrocitárias Totais

RC – Rodlet cell (célula de bastonetes)

FSA – Fração Solúvel de Petróleo

WSA – Water Soluble Fraction

ppm – partes por milhão

5d 0% - período de 5 dias, exposição a 0% de FSA

5d 10% - período de 5 dias, exposição a 10% de FSA

5d 20% - período de 5 dias, exposição a 20% de FSA

10d 0% - período de 10 dias, exposição a 0% de FSA

10d 10% - período de 10 dias, exposição a 10% de FSA

10d 20% - período de 10 dias, exposição a 20% de FSA

15d 0% - período de 15 dias, exposição a 0% de FSA

15d 10% - período de 15 dias, exposição a 10% de FSA

15d 20% - período de 15 dias, exposição a 20% de FSA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Antártida.....	16
1.2 Área de Estudo.....	16
1.3 Geologia.....	18
1.4 Ictiofauna.....	18
1.5 Ordem Perciformes. Subordem Notothenioidei.....	19
1.6 Trematomus.....	20
1.7 Metabolismo dos organismos aquáticos.....	21
1.8 Xenobióticos, água e poluição petrolífera.....	22
1.9 Biomarcadores.....	24
1.10 Micronúcleo e outras anomalias eritrocitárias.....	25
1.11 Índice de alterações histológicas.....	26
1.12 Células de Bastonetes (Rodlet cells).....	27
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Coleta dos peixes.....	32
3.2 Parâmetros físico-químicos da água.....	33
3.3 Alimentação.....	33
3.4 Preparação da fração solúvel de petróleo FSA.....	33
3.5 Exposição dos <i>Trematomus newnesi</i>	34
3.6 Anestesia.....	35
3.7 Biometria.....	35
3.8 Processamento dos materiais biológicos obtidos.....	36
3.9 Análise.....	37
3.9.1 Células de bastonetes.....	37
3.9.2 Brânquias.....	38
3.9.3 Fígado.....	41
3.9.4 Valor Médio de Avaliação (VMA).....	42
3.9.5 Sangue.....	43
3.9.5.1 Fixação das amostras.....	43

3.9.5.2 <i>Contagem de micronúcleos e outras anomalias eritrocitárias</i>	43
3.9.6 Fixação e processamento para microscopia eletrônica de transmissão.....	44
3.10 Análise dos resultados obtidos	45
4 RESULTADOS	46
4.1 Biometria.....	46
4.2 Células de bastonetes.....	46
4.3 Índice de Alterações Histológicas (IAH) e Valor Médio de Avaliação (VMA) das brânquias.....	49
4.4 Índice de Alterações Histológicas (IAH) e Valor Médio de Avaliação (VMA) do fígado.....	54
4.5 Frequência de micronúcleos e outras anormalidades eritrocitárias.....	56
5 DISCUSSÃO	62
6 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Antártida

A descoberta do continente antártico é creditada ao americano Nathaniel Palmer (em 17 de novembro de 1820) (SCHUCH, 1994). Apesar disso, as regiões da Antártida podem ter sido observadas pela primeira vez ao longo do século XVI. Prova disso é um mapa representando o globo terrestre, descoberto na Europa, datado de 1531, de autoria de Oronce Fine, um matemático francês, com algumas características básicas cartográficas desse continente. Esse conhecimento do matemático provavelmente é devido a informações sobre as terras antárticas (em uma denominação mais clássica, *Terra Australis*) de capitães de navio e viajantes daquele século e de séculos anteriores. No entanto, apenas datações provenientes da segunda metade do século XVIII demonstram o início de incursões que levariam à exploração antártica: obtenção das áreas geográficas, construção de estações pesqueiras e ocupação permanente de bases de pesquisa científica.

A Nova Zelândia (a Sul da Austrália) foi descoberta pelos ingleses entre 1772 e 1775 (avistada pelo oficial James Cook). Entretanto, mesmo navegando por mais 70° ao Sul, não avistou as terras antárticas, James Cook observou, no entanto, muitas baleias e focas na região navegada, o que suscitou o interesse de navios baleeiros à procura destes recursos. Tal interesse fez com que na primeira metade do século XIX (cerca de 1820), a Península Antártica e as ilhas próximas foram ocupadas por estações de pesca britânicas e norueguesas. Os exploradores mais notáveis desses recursos foram Fabian Bellingshausen (Rússia), capitão Edward Bransfield (Inglaterra), e pelo caçador de focas Nathaniel Palmer (Estados Unidos da América) (SCHUCH, 1994).

1.2 Área de Estudo

A estação Brasileira “Comandante Ferraz” (62°05’00” S, 58°23’28”W) está instalada na Península Keller, margeando a Enseada Martel, na Baía do Almirantado, Ilha do Rei George. Essa ilha é a maior ilha do arquipélago Shetlands do Sul (South Shetlands), localizando-se no lado ocidental da Península Antártica. A denominação “Á-

rea Antártica Especialmente Gerenciada” refere-se às áreas de proteção histórica e ambiental abrangendo também o ambiente marinho. Essa denominação se aplica à Baía do Almirantado, recebendo grande interesse pelo seu ecossistema que apresenta grande variação ambiental quanto à cobertura de gelo marinho e terrestre e das condições climáticas.

As profundidades das águas da Baía são variáveis – desde águas rasas até mais de quinhentos metros. A média da temperatura atmosférica anual é de -2,8 °C, sendo que no verão a média é de 0,9 °C e no inverno -7 °C (WEBER; MONTONE, 2006).

Os estudos da Península Antártica começaram entre 1897 e 1899, pela equipe de Adrien de Guerlache a bordo do navio *Bélgica*. Posteriormente, entre 1950 e 1952, ocorreu a primeira expedição internacional, com a participação de Inglaterra, Noruega e Suécia (BROMBERG et al., 2000).

No Ano Geofísico Internacional (1 de julho de 1957 a 31 de dezembro de 1958) foi realizado um programa científico de grande envergadura, contando com a participação de Argentina, Áustria, Bélgica, Chile, França, Japão, Nova Zelândia, Noruega, África do Sul, ex-URSS, Reino Unido e Estados Unidos (12 países ao total). Partindo desse programa, em 1959 esses mesmos doze países assinaram o Tratado da Antártida. Esse foi o primeiro estatuto da História para a Antártida. Depois de todos os movimentos destes países até a conclusão do Tratado, muitas nações estabeleceram estações de pesquisa científica.

As partes do Tratado resolvem que a liberdade de pesquisa é assegurada, com os seus resultados postos em livre circulação e cambiável entre os países; observando-se a natureza pacífica a que se destinam as atividades naquele continente, há a possibilidade de desembarque de massa humana militar e seus equipamentos, desde que o objetivo seja pesquisa pacífica ou outro objetivo de caráter pacífico; a área de jurisdição do Tratado situa-se ao sul de sessenta graus de latitude sul, incluindo plataformas de gelo, mas sem que seja violado o direito internacional aplicável ao alto-mar; e o mais importante num mundo atômico, a realização de explosões nucleares e o depósito de resíduos radioativos é proibida.

1.3 Geologia

A geologia antártica é baseada na teoria da Deriva Continental (Placas Tectônicas), elaborada no início do século XX. Resumidamente, a teoria propõe todos os cinco continentes estavam juntos em um único “supercontinente”, a *Pangea*, cuja porção mais ao sul, ou austral, denomina-se *Gondwana*. Há 220 milhões de anos, houve o início da movimentação das placas. A imponente *Pangea* começava a se fragmentar, dispersando os continentes (Schuch, 1994).

Os continentes continuaram migrando no período Jurássico e Cretáceo. Há 55 milhões de anos, então, a Antártida se separou definitivamente da Austrália (Rocha-Campos e Santos, 2000).

De todos os continentes, o antártico foi o que mais derivou para o sul e o manto de gelo que o recobre atualmente representa o maior sorvedouro de calor da Terra, influenciando profundamente as condições climáticas do clima global (ROCHA-CAMPOS; SANTOS, 2000).

Geologicamente, a Península Antártica é uma continuação direta da Cordilheira dos Andes e a maior parte de suas terras é formada por depósitos vulcânicos da Era Mesozóica, do fim do Período Cretáceo e início do período Jurássico (SCHUCH, 1994).

1.4 Ictiofauna

A fauna de peixes (ictiofauna) da Antártida é bastante recente (se considerada a Escala geológica) e predominantemente endêmica. O grupo que domina o hábitat é pertencente à subordem Notothenioidei e o endemismo entre os peixes dessa subclasse chega a 97% para as espécies e 85% para os gêneros (EASTMAN; GRANDE, 1989).

Não existem registros fósseis dos nototeniídes, mas foram encontrados fósseis de peixes taxonomicamente diversos nos depósitos antárticos formados, aproximadamente, ao mesmo tempo em que os nototeniídes emergiram. Contudo, esses peixes não estão intimamente relacionados aos nototeniídes e também não são encontrados entre a fauna recente. Os três principais fatores – baixa temperatura, habitat limitado e considerações tróficas – tidos como responsáveis pelas mudanças

na ictiofauna ou pela limitada diversidade na região antártica, ainda são bastante discutidos (EASTMAN; GRANDE, 1989).

O primeiro fator a ser considerado é a temperatura, embora, segundo Clarke e Crame (1989) e Eastman e Grande (1989), a temperatura não tenha sido o fator maior na qual cai a responsabilidade pela eliminação da ictiofauna anterior e pela baixa diversidade da fauna recente. Da mesma maneira não seria plausível afirmar que a emergência dos nototeniídeos provavelmente tenha sido uma resposta direta ao resfriamento, mas sim uma radiação evolutiva de peixes com características únicas, radiação essa devido ao resfriamento do meio, adaptativas à baixa temperatura da água, a saber: presença de glicoproteínas anticongelantes, adaptação enzimática e adaptações de membrana celular.

Outro fator importante é a limitação do habitat, uma vez que a plataforma antártica é bastante estreita na maior parte de sua extensão, com profundidades que variam entre 500 e 900 metros (quatro vezes maior do que as plataformas de outros continentes). Não obstante isso, a glaciação reduziu potenciais logradouros marinhos para espécies bentônicas de águas rasas (EASTMAN; GRANDE, 1989).

terceiro fator é a oscilação sazonal do suprimento de alimento – um fator marcante em algumas áreas que pode ter limitado a evolução de certos tipos tróficos entre os peixes (EASTMAN; GRANDE, 1989).

1.5 Ordem Perciforme. Subordem Notothenioidei.

Os nototeniídeos recentes são peixes de fundo e vivem a até 1000 metros de profundidade. Sem competição e com isolamento garantido, houve a oportunidade de especiação intra-específica (dentro do próprio grupo). Tendo 101 espécies conhecidas, as famílias mais expressivas são a Nototheniidae e a Channichthyidae (RODRIGUES et al., 2011). Os peixes nototeniídeos preenchem nichos ecológicos normalmente ocupados por peixes de diversos grupos em regiões temperadas. Isso é corroborado por Eastman (1993), que descreve esses peixes como tendo representantes de nove tipos ecológicos:

- a) grandes predadores mesopelágicos, ecologicamente semelhantes ao tubarão;
- b) predadores mesopelágicos de tamanho médio;

- c) cardumes de pequenos peixes mesopelágicos zooplantívoros;
- d) espécies criopelágicas: *Pagotenia borchgrevinki* / *Trematomus newnesi*;
- e) espécies epibentônicas: *Pseudotrematomus eulopidotus*;
- f) espécies semipelágicas: *Pagetopsis macropterus*;
- g) espécies bentônicas: *Dissostichus mawsoni* “antarctic toothfish”;
- h) espécies com mudanças ontogenéticas no ciclo de vida: *Pleuragramma antarcticum*;
- i) espécies eurialinas, com distribuição não-antártica.

De acordo com Eastman e DeVries (1982), o *Trematomus newnesi* é um peixe do grupo 4².

1.6 Trematomus

Um grupo ímpar de 90-100 espécies de peixes perciformes é encontrado no ambiente antártico. Os peixes notothenioidea são altamente endêmicos com 86% dos gêneros e 95% das espécies confinados às águas Antárticas. Os notothenioides são hipoteticamente derivados de um peciforme de fundo oceânico, aproximadamente há 40 milhões de anos. Baixa temperatura da água, isolamento geofigura extremo e falta de correntes sulistas de fluxo de superfície tem prevenido muitos outros grupos de peixes de se estabelecerem nas águas antárticas. O papel dos peixes notothenioides no ecossistema antártico marinho ainda é pouco conhecido (EASTMAN; DEVRIES, 1982).

Os peixes notothenídeos, como são chamados os peixes da família nototheniidae, tem uma distribuição circumantártica nas águas rasas do continente e das ilhas adjacentes (DE WITT; HEEMSTRA, 1990).

A ecologia deste peixe é pouco estudada, se comparada aos outros gêneros da mesma família como, por exemplo, a *Notothenia cooriceps*. Uma das maneiras de se ver uma provável grande diferença de ecologia entre esses peixes se comparada à de outros peixes teleósteos mais estudados, por exemplo, os tropicais, é a falta de uma peça anatômica apontada por taxonomistas como grande divisora entre dois

²**Criopelágico e semipelágico:** embora “criopelágico” seja a definição mais comum para esse peixe, por ser encontrado se alimentando logo abaixo das placas de gelo ou mesmo na superfície inferior destas, Eastman e DeVries o descrevem como tendo bastante plasticidade trófica: este fato leva-os a enquadrá-lo também no grupo 6 – semipelágico.

grandes grupos gerais de peixes (ósseos e cartilagosos): a bexiga natatória. Alguns estudos de flutuabilidade têm apontado o baixo peso desses peixes como uma provável resposta à falta desta estrutura para sua capacidade de flutuação, uma vez que o *Trematomus newnesi* venha a ser classificado como um peixe semipelágico (se mantém parte de sua vida no substrato, embora se alimente na coluna d'água até mesmo na superfície inferior da placa/plataforma de gelo antártica). E mesmo entre as espécies do gênero *Trematomus* há diferença em sua classificação: os peixes *T. bernachii* Boulenger e *T. centronotus* Regan, por exemplo, são considerados espécies bênticas típicas, passando mais tempo no substrato oceânico do que na coluna d'água; estas espécies têm adaptabilidades morfológicas para este modo de vida: corpos achatados e especializações de contato com o substrato (EASTMAN; DEVRIES, 1982).

A alimentação dos peixes do gênero *Trematomus* se baseia em anfípodas, poliquetas, pequenos peixes, ovos de peixes e eufausídeos (*Euphausia superba*, ou krill) (EASTMAN; DEVRIES, 1982).

1.7 Metabolismo dos organismos polares

Num ambiente gélido como a região antártica, há muitos que consideram a temperatura um fator preponderante para a adaptação e seleção dos organismos polares. Outros autores, no entanto, afirmam que a temperatura é importante, mas não o fator principal. Apesar das temperaturas extremas, para a grande maioria dos organismos marinhos polares (isiosmóticos ou hiperosmóticos) o congelamento não aparenta ser um grande problema, uma vez que sua relação osmótica com a água do mar determina que eles não congelem se o mar não congelar. (CLARKE, 1983)

Essa habilidade única de evitar congelar decorre de múltiplos mecanismos de resistência ao congelamento. Quando acontece a produção de calor fisiológico e a conservação do mesmo - é o caso de animais homeotermos, como baleias, focas e pingüins. Um segundo mecanismo de resistência é comportamental, onde um animal procura um local menos frio. O *super-resfriamento*, outro mecanismo bastante eficaz, consiste na idéia de que a água seja extremamente fria e os organismos que nela estão presentes não congelam. Se pensar outros organismos que não a maioria dos peixes, como pequenos invertebrados, têm crioprotetores como sorbitol e/ou

glicerol, tolerando congelamentos sem restrições. Paralelamente a esses mecanismos, a físico-química do animal ajuda na árdua tarefa de mantê-lo protegido do congelamento, onde o organismo pode regular a quantidade de sal em relação ao da água do mar (isosmóticos ou hiperosmóticos), ou com a produção de uma glicoproteína (estabilizador), causando o momento de *super-resfriamento* (CLARKE, 1983).

A maioria dos experimentos realizados tratando das atividades enzimáticas têm sido efetuadas apenas em organismos euritermais, mais freqüentemente em peixes aclimatados em laboratório. O problema, no entanto, é que a maneira como os peixes euritermais lidam com o curto período de mudanças de temperatura é, muito possivelmente, diferente das mudanças envolvidas na adaptação evolucionária (CLARKE, 1983). Algumas espécies acumulam lipídios (triacilglicerol). Essa substância pode ser utilizada como energia reserva. Algumas classes de glicoproteínas podem ser utilizadas como agente adicional de anticongelamento³.

Esses dados advêm de uma discussão anterior proposta por trabalhos pioneiros datados da metade do século XX, que procuraram compreender as estratégias adaptativas apresentadas por organismos polares às baixas temperaturas. Com isso, foi elaborada, por Scholander et al., em 1953, a teoria da “Adaptação Metabólica ao Frio”, que posteriormente foi endossada por Wohlschalg em 1964 (e posteriormente Opalinski, em 1979). Essa teoria explana que os organismos pecilotérmicos marinhos polares têm taxas metabólicas mais altas do que seria esperado quando da extrapolação de dados obtidos com espécies de hábitos parecidos de regiões temperadas para as temperaturas polares. No entanto, há diferentes trabalhos que questionam essa teoria, como aponta Clarke (1991).

1.8 Xenobióticos, água e a poluição petrolífera

A poluição dos meios aquáticos acontece em um ritmo mais veloz do que a poluição atmosférica, pois além do número de compostos lançados nas águas ser muito maior que os poluentes encontrados no ar, em determinados meios aquáticos a capacidade de dispersão pode ser muito reduzida. Além disso, a ação conjunta de

³ **AFGP:** A mudança molecular mais importante na evolução adaptativa de peixes antárticos foi a glicoproteína anticongelante (anti-freeze glycoprotein - AFGP) nos fluídos biológicos (5 a 14 milhões de anos atrás). Rodrigues et al., 2011.

vários poluentes em determinadas características físicas da água, tais como pH e temperatura, podem potencializar ainda mais os efeitos tóxicos dos poluentes. (PHILLIPS, 1977; HELLAWELL, 1988).

As substâncias químicas estranhas ao meio, as quais podem ser produzidas pelo homem ou podem ser de origem natural, são chamadas de “xenobióticos” e sua quantidade e variedade estão em contínuo aumento (LIVINGSTONE, 1993; 1998). As diferentes características fisiológicas, anatômicas e adaptativas das inúmeras espécies de organismos determinam diferentes padrões de acumulação de xenobióticos. Dessa forma, além de depender do balanço entre a taxa de assimilação e as taxas de metabolização e eliminação dos compostos químicos, sofrem variações decorrentes da sazonalidade, que pode influenciar diretamente na disponibilidade e assimilação de determinados xenobióticos.

Sendo assim, é fato que as preocupações com o meio ambiente tenham aumentado nos últimos anos, com um crescimento nos países industrializados, numa consciência construída nessas sociedades sobre a importância da qualidade ambiental como base para a preservação da vida. O petróleo é representativo quando das fontes primordiais de combustível da humanidade; no entanto, operações como a exploração deste recurso, o transporte, refino e distribuição são consideradas fontes potencialmente poluidoras do ambiente (KATAOKA, 2001). Com base nesse paradigma, nas duas últimas décadas os governos têm mudado seu foco de atenção para a contaminação e a exploração contínua dos recursos hídricos (LOPES, 2005), e a contaminação por derivados de petróleo é uma das mais significativas.

Apesar dos significativos avanços e melhorias implementados nas atividades de exploração, transporte e armazenamento de petróleo, a frequência de acidentes ainda é relevante. A cada ano, cerca de 2,5 milhões de toneladas são lançadas no oceano (ETKIN, 1998)

Os hidrocarbonetos do petróleo são agrupados em quatro classes básicas, segundo o arranjo estrutural dos átomos de carbono e hidrogênio: aromáticos, parafínicos, naftênicos e oleofínicos (GOUVEIA et al., 2003). Os aromáticos são os que apresentam maior toxicidade.

Os hidrocarbonetos aromáticos caracterizam-se por apresentar anéis benzênicos contendo seis átomos de carbono, arranjados em um ciclo com três duplas ligações alternadas. O benzeno é o mais simples dos aromáticos e a grande maioria

das substâncias que pertencem a esta classe deriva desse composto, relativamente solúvel em água, presente em quase todos os tipos de petróleo e nos seus derivados. Tais contaminantes são geralmente acumulados em altas concentrações em tecidos biológicos, pois as taxas de assimilação podem exceder as taxas de metabolização e eliminação. Em vertebrados, por exemplo, a metabolização e a eliminação, podem superar a taxa de assimilação, acarretando em uma acumulação mínima. Porém o acúmulo ao longo da cadeia alimentar pode anular facilmente a eliminação de determinados contaminantes.

Segundo Weber e Montone, (2006) a análise dos dados entre 1989 a 2002 permite concluir que o ambiente marinho próximo à Estação Antártica Brasileira “Comandante Ferraz” pode ser considerado apenas levemente contaminado por hidrocarbonetos aromáticos de petróleo (PAHs).

Como ocorrem diferenças nas formas de se acumular ou metabolizar os xenobióticos, e nas respostas dos organismos aos seus efeitos, existe a necessidade de se detectar e avaliar o impacto de poluentes nos organismos expostos, e não somente avaliar a quantidade de poluentes presentes no ambiente e nos animais. Esta necessidade origina o estudo e desenvolvimento de biomarcadores morfológicos, moleculares, bioquímicos ou fisiológicos, que detectem efeitos biológicos nos organismos.

Segundo Livingstone (1993) os biomarcadores podem ser fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes e que permitem inferir o grau de contaminação. Também são consideradas como biomarcadores as respostas fisiológicas, comportamentais ou energéticas dos organismos expostos. Existem assim biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

1.9 Biomarcadores

Alterações biológicas mensuráveis que evidenciem a exposição dos organismos a um poluente são denominadas biomarcadores de exposição, tais como a ati-

vidade de enzimas antioxidantes e a concentração de metalotioneínas⁴. Por sua vez, os biomarcadores de efeito são aqueles que caracterizam um efeito tóxico decorrente do contato de um organismo ao poluente, tal como a peroxidação de lipídios ou o dano de DNA (JESUS; CARVALHO, 2008).

Observar alterações nas brânquias e no fígado é uma maneira de verificação se um organismo está saudável ou não, fazendo com que resultados obtidos com outros tipos de biomarcadores não sejam interpretados erroneamente. O contato direto das brânquias delimitando o meio interno do organismo e o ambiente faz com que estas funcionem como uma interface seletiva. Além da função respiratória, as brânquias são responsáveis pelo equilíbrio ácido-base (LAURENT; PERRY, 1990), pela osmorregulação (RANDAL; WRIGT; 1990), pela excreção de produtos nitrogenados (SAYER; DAVENPORT, 1987; PARTEARROYO; PILLING; JONES, 1992) e pela recepção de estímulos (BAILLY; DUNNEL-HERB; LAURENT, 1992).

Outro órgão amplamente estudado para avaliar alterações ambientais é o fígado, devido à sua localização e seu papel central no metabolismo, por exemplo, transformando glicose em glicogênio e estocando-o até que haja uma necessidade metabólica, mas este estoque não é feito apenas com a via glicose-glicogênio, como também vitaminas, minerais e ferro. Suas células produzem proteínas, lipídeos, triglicerídeos, colesterol e lipoproteínas. O fígado tem papel fundamental no metabolismo e nas transformações bioquímicas de poluentes do ambiente, o que inevitavelmente reflete na sua integridade, criando lesões e outras alterações histopatológicas do parênquima hepático ou dos ductos biliares (ROBERTS, 1978).

1.10 Micronúcleos e anomalias eritrocitárias.

Dentre as técnicas citogenéticas atuais, o teste micronúcleo é um método relativamente simples utilizado para detectar o efeito genotóxico de compostos químicos. Micronúcleos são massas intracitoplasmáticas de cromatina com a aparência de um pequeno núcleo, que surgem de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros deixados para trás no estágio de anáfase da divisão celular (FENECH et al.,

⁴ **Biologia Molecular:** Biomarcadores bioquímicos de peixes têm sido usados para avaliar o impacto de poluentes no ambiente e na recuperação de meio ambientes. Por exemplo, informação enzimática na L-arginina, xenobióticos e defesa antioxidante. (Rodrigues et al., 2011)

1999). A frequência de células micronucleadas tem servido como índice de quebras cromossômicas e disfunções no aparato mitótico por mais de 20 anos, e apresenta vantagens como simplicidade, confiabilidade e sensibilidade (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000), além de baixo custo e rapidez.

Outra vantagem do uso de biomarcadores, como o teste micronúcleo, no estudo de toxicidade aquática está relacionada à sua habilidade de fornecer um aviso precoce de estresse tóxico nos organismos, antes que respostas na comunidade e no ecossistema possam ser detectadas (MARTIN; BLACK, 1996).

Recentemente, diversos estudos têm descrito a presença de outras anormalidades nucleares eritrocitárias em células de peixes expostos a substâncias genotóxicas (ÇAVAS et al 2005a), e estas anormalidades têm sido usadas com sucesso (PACHECO; SANTOS, 1997, 1998, 2001, 2002) para complementar a contagem de micronúcleos em pesquisas rotineiras de genotoxicidade (ÇAVAS et al 2005). Tais anormalidades nucleares eritrocitárias (ENA) são consideradas análogas a micronúcleos e são classificadas basicamente como núcleo reniforme (K), núcleo lobado (L) e núcleo segmentado (S) (AYLLON; GARCIA-VAZQUES 2000).

Testes para avaliar a toxicidade dos hidrocarbonetos do petróleo e seus derivados em organismos aquáticos vêm sendo desenvolvidos por vários autores, em sua maioria para bivalves e peixes (TABAN et al. 2004, MARIA; CORREIA; SANTOS 2003, GRAVATO; SANTOS 2001). Apesar destas investigações prévias, alguns níveis de resposta toxicológica em peixes permanecem pouco compreendidos, revelando a falta de dados sobre mecanismos de estresse, tais como biotransformação e respostas genotóxicas (PACHECO; SANTOS, 2001).

1.11 Índice de alterações histológicas (IAH)

IAH foi inicialmente elaborado em 1994 por Polecsic e Mitrovic-Tudundzic, que resultou em uma tabela de alterações teciduais classificando-as em graus de danos.

A resposta às diferentes concentrações de poluentes pelas células costuma ser mais rápida do que aquelas apresentadas pelos processos fisiológicos (SASTRY; MILLER, 1981; BERNET et al, 1999; FERNANDES E MAZON, 2003; FRACÁCIO et al., 2003; AKAISHI et al., 2004), tornando o processo histológico uma ferramenta com respostas muitas vezes de horas ou dias; o monitoramento histológico tem uma

sensibilidade maior do que os métodos mais clássicos de toxicologia (WESTER et al., 2002), uma vez que efeitos em nível histológico podem ser vistos em dosagens muito mais baixas do que aquelas necessárias para os testes que trabalham com “end points”; e as análises histológicas podem facilitar a identificação do grau de degradação ambiental, quando alterações estruturais podem ser observadas em animais amostrados diretamente do ambiente (FRACÁCIO et al., 2003). Förlin et al. (1986) também salientam a necessidade da utilização de parâmetros de resposta semelhantes tanto em laboratório como no campo, para uma melhor análise dos efeitos tóxicos subletais em populações naturais.

1.12 Células de Bastonetes (*Rodlet cells* - RCs)

Células de bastonetes ou *rodlet cells* - em inglês (RCs) - são células encontradas freqüentemente em teleósteos marinhos e dulcícolas (REITE, 2005; MANERA; .; DEZFULI, 2004), cuja função e origem permanecem desconhecidas. Aparentemente não estão presentes em todos os peixes teleósteos. Sua primeira descrição foi feita por Thelohan em 1892 apud Schmachtenberg⁵ (2007), que pensou serem estas células esporozoários Apicomplexa parasita dos peixes; em 1895 essas estruturas receberam a denominação *Rhabdospora telohani*, por Laguesse apud Schmachtenberg⁶ (2007), em 1895. Plehn, refutando tal hipótese em 1906 apud Schmachtenberg⁷ (2007), propõem que as RCs seriam células de defesa com grânulos tendo ação endógena. Ao longo do século XX, e até o momento, ambas as hipóteses foram mantidas, uma vez que ainda não se chegou a um consenso, sendo que há debates entre os autores sobre homologias de suas estruturas típicas, homologias essas que poderiam ser indicativas de sua origem (SCHMASCHTEMBERG, 2007).

As RCs foram observadas em muitos órgãos e porções (brânquias – MAZON et al., 2007/ BARBER et al., 1979/ LEINO, 1982/ DEZFULI et al., 2003; rim cefálico –

⁵ THELOHAN P. Sur des sporozoaires indetermines parasites des poissons. **Journal d'Anatomie et Physiologie Paris (France)**, v. 28, p. 163-171, 1892.

⁶ LAGUESSE, E. Sur le pancreas du Crenilabre et particulierement sur le pancreas intra-hepatique. **Revue de Biologie Nord**, v. 7, p. 343-363, 1895.

⁷ PLEHN, M. Ueber eingetuemliche Druesenzellen im Gefaesssystem und in aderen Organen bei Fischen. **Anatomischer Anzeiger**, v. 28, p.192-203, 1906.

MAZON et al., 2007; rim – FISHELSON; BECKER, 1999; tîmo – SIDERITS; BIELEK, 2009; ducto biliar – DEZFULI et al., 2000; intestino – MAZON et al., 2007) de diversos teleósteos marinhos e dulcícolas, com diferentes morfologias em cada espécie. As hipóteses acerca de sua origem endógena afirmam que as RCs são de origem epitelial.

Os argumentos principais a favor da hipótese parasítica das RCs incluem o fato de seu número variar de peixe para peixe; às vezes não podem ser encontradas em todos os indivíduos da mesma espécie; as células podem ser encontradas em diferentes tecidos dos mesmos espécimes; elas têm uma cápsula característica; têm inclusões parecidas com esporozoítas. Os autores que discordam desta visão listam uma série de características dos protozoários Apicomplexa que não serão encontradas nas RCs como, por exemplo, a falta dos típicos estágios do ciclo de vida de parasitas esporozoários; além disso, as RCs nunca foram vistas dentro de células hospedeiras, o oposto, portanto, a esses parasitas intracelulares obrigatórios. Embora algumas espécies de Apicomplexa mostrem pequena especificidade de locação (host specificity), uma distribuição universal sem discriminação significativa de tecido - como visto no caso das RCs - é inusitada para um parasita (SCHMACHTENBERG, 2007).

Como o mesmo autor claramente expõe, “como a evolução natural é essencialmente conservativa e o número de tipos de células de vertebrados está limitada a cerca de duzentas, é difícil explicar porque um único tipo celular deveria aparecer em teleósteos e estar ausente de todos os “vertebrados superiores”⁸.

Estudos ultraestruturais têm mostrado que os bastonetes (*rodlets*) estão dispostos dentro de compartimentos, chamados *rodlet sacs* (sacos de bastonetes) quando observados ao microscópio eletrônico de transmissão. Os bastonetes aparecem na microscopia eletrônica de transmissão com a porção central elétron densa. Quando da “degranulação” da célula, estudos ultra-estruturais têm demonstrado que os bastonetes inteiros são expulsos pela porção anterior da célula, com seu núcleo

⁸ **Vertebrados superiores:** Embora este seja um termo bastante utilizado para a designação dos representantes do subfiló vertebrata com classificação taxonômica posterior (em nível de complexidade) aos peixes teleósteos, esse termo não é consenso entre os estudiosos. Um termo mais apropriado seria a designação inglesa “higher vertebrates”.

possuindo polaridade, a manter-se na parte posterior da célula (KRAMER; POTTER, 2002). Os mesmos autores descreveram as células imaturas tendo formato redondo, e a cápsula que as envolve ainda estão bastante finas neste período. As células maduras aparentam o formato elíptico, com a cápsula que envolve a membrana celular bastante espessa, e com maior número de bastonetes.

A periferia da célula consiste em uma membrana plasmática em íntimo contato com uma cápsula. A cápsula é composta por uma rede compacta e densa de microfibrilas que formam uma estrutura contínua em íntimo contato com a porção interna da célula. A periferia das cápsulas e das membranas externas é irregular e ligeiramente ondulada, com microvilos que às vezes se projetam para fora. A região apical da célula também contém microvilos, mas nesta região as microfibrilas das cápsulas são desorganizadas. Não parece haver junções entre as RCs e as células vizinhas. As mitocôndrias localizam-se na parte apical da célula, que tem proeminentes aparelhos de Golgi. O retículo endoplasmático rugoso se distende e apresenta vesículas (SCHMACHTENBERG, 2007).

As RCs foram também estudadas quando da contaminação por parasitas e estresse ambiental. Mazon (2007) observou que quando a carpa é infectada com *Trypanoplasma borreli* as células com bastonetes são observadas em maior quantidade nas brânquias, enquanto que em situação de estresse estas células serão encontradas em maior quantidade no rim cefálico destes animais. Dezfuli (2000) observou a presença destas células quando da infestação em *Phoxinus phoxinus* por um nematódeo. (IGER; ABRAHAM, 1997) expuseram carpas e trutas a um grande número de condições anormais (estressores), incluindo metais pesados e água destilada, verificaram um aumento no número de células de bastonetes na pele destes espécimes. Estudos com parasitas helmintos têm demonstrado um intenso aparecimento de RCs descarregando seus bastonetes na região de interface com o parasita, discutindo a migração deste tipo celular para outros órgãos a partir do rim cefálico em caso de infecções (DEZFULI, 1998).

Em se tratando de pesquisas antárticas sobre a problemática ambiental, há certa carência em trabalhos voltados à questão do impacto na macrobiota piscívora antártica, uma vez que estudos maiores estão voltados aos macroinvertebrados daquela região. Esta preferência pelo estudo dos invertebrados dá-se pelo seu uso já consagrado em biomonitoração de ambientes próximos a habitações humanas. Não

obstante esta carência de estudos em peixes frente à exposição por petróleo, também se descortina a necessidade de busca por biomarcadores para este tipo de poluição, que são bastante esparsas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar se o peixe antártico *Trematomus newnesi* pode ser usado como um bom bioindicador para contaminação pela fração solúvel de petróleo (FSA) por um protocolo histológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se os métodos utilizados nesse trabalho – Índice de Alterações Histológicas e Valor Médio de Avaliação de brânquias e fígado do *Trematomus newnesi*, teste de micronúcleo e outras anomalias nucleares eritrocitárias – podem ser prováveis biomarcadores para poluição petrolífera.

Além disso, outro objetivo foi verificar se a presença ou quantidade de RCs nas brânquias (células de bastonetes) pode ser usada como uma ligação com a presença de fração solúvel do petróleo em água, uma vez que alguns trabalhos as têm relacionado com condições anômalas do ambiente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos Peixes

Os espécimes foram coletados na Antártica. Foram coletados 36 espécimes de *Trematomus newnesi*, de ambos os sexos, utilizando uma rede de arrasto pequena, operada por bote de borracha (Zodiac®, Carolina do Sul, Summerville, USA), nas proximidades da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) (S 62°09.568'; W 058°26.959'), na Baía do almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetland do Sul, Antártica (Figura 1).

Os animais foram aclimatados de 0 ± 1 °C em tanques de 500 litros, com água retirada das proximidades da EACF e mantendo arejamento artificial. A água do mar foi trocada diariamente (parcialmente: 60%) com nova água das proximidades da Estação e o fotoperíodo foi padrão: dezessete horas claro e oito horas escuro (simulando o fotoperíodo do verão antártico).

Figura 1. Local onde se encontra a Estação Antártica Comandante Ferraz.

Nestas proximidades foram coletados os espécimes de *Trematomus newnesi*
FONTE: National Aeronautics and Space Administration (NASA, USA)

3.2 Parâmetros físico-químicos da Água do Mar do Biotério Marinho

Salinidade: foi mantida em 34‰, monitorada semanalmente através de um refratômetro para salinidade com compensação automática para temperatura (SR-3),.

Nitrito: foi mantido entre 0 e 0,1mg/l, monitorado semanalmente através de teste de nitrito(Tetratest® (Tetra Werke, Melle, Alemanha).

Temperatura: A temperatura da água foi mantida a $0,0 \pm 0,2$ °C com termostatos full-gage junto a garrafas PET com água do mar congelada, e os termostatos, ligados a aquecedores de 300 Watts de potência. As leituras foram realizadas diariamente pela manhã utilizando-se 2 termômetros de máxima e mínima, imersos no fundo de tanques diferentes. Nesta leitura foram obtidas a temperatura máxima e a mínima do dia anterior. Os tanques foram mantidos no interior de uma câmara fria com a temperatura mantida a $0 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3 Alimentação

Cada animal foi alimentado uma vez ao dia com 3 a 5 copépodos vivos colhidos na mesma região do habitat do *Trematomus newnesi*.

3.4 Preparação da fração solúvel do petróleo (FSA)

Amostras de 20 litros de petróleo bruto (petróleo Albacora da p 31) foram requisitadas ao centro petroquímico da Petrobrás do município de São Sebastião – SP–TEBAR e a partir deste foram preparadas soluções de 100% FSA, seguindo o protocolo de Anderson et al. (1974). Resumidamente, uma parte de óleo foi adicionada a 9 partes de água do mar (filtrada em malha de 0.3 µm, salinidade 35‰) em um balão de decantação, a mistura foi realizada por 20 horas utilizando-se um agitador magnético. A fase do fundo (FSA) foi separada da fração não solúvel. A composição química da FSA preparada por esse método foi descrita por Anderson et al. (1974) e analisada por espectros de fluorescência em aparelho Fluorolog (SPEX, Metushen, New Jersey), em modo sincronizado ($\Delta\lambda=10\text{nm}$) de excitação e emissão em ângulo reto. Os extratos de FSA foram dissolvidos em clorofórmio (NICODEM et al., 2001).

Posteriormente foram retiradas alíquotas das soluções de FSA recém-preparadas as quais foram diluídas, a 10 e 20%, em aquários contendo 5 litros de água do mar, de tal modo que as concentrações finais fossem de 0,4 e 0,8 ppm, respectivamente (NICODEM et al. 2001). Foi utilizada água marinha esterilizada, condicionada em frascos lacrados e resfriados a $2,0 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, minimizando-se, assim, a evaporação e a ação bacteriana (Figura 2).

Figura 2: Dispositivo utilizado para a confecção da fração solúvel do petróleo.

FONTE: (VIVAI, 2011) (Cortesia de Phan Van Ngan)

3.5 Exposição dos *Trematomus newnesi* a diferentes concentrações de petróleo

Os animais foram expostos por períodos de 5, 10 e 15 dias a diferentes concentrações de frações solúveis de petróleo (0,4 e 0,8 ppm) em caixas plásticas de 5 litros. Para cada concentração em determinado período foram utilizados 4 animais (repetições do experimento), totalizando 12 animais por período e 36 no total do experimento (Figura 3). A água com FSA foi trocada a cada dois dias e meio (60 horas), totalizando em 195 litros de água, que após o uso foi exposta à evaporação em

local apropriado da EACF. O restante (aproximadamente 200 litros) foi enviado para os laboratórios da Universidade de São Paulo onde, após o tratamento através da evaporação, foi devolvido à Petrobrás.

Figura 3: Esquema explicativo da montagem dos tanques para manejo dos animais

FONTE: (VIVAI, 2011)

3.6 Anestesia

Todo e qualquer animal manipulado experimentalmente foi previamente anestesiado com xilocaína a 40 ppm, diluída previamente em álcool, que foi em seguida dissolvida no recipiente no qual o peixe foi anestesiado (balde plástico de 10 l) (SILVA et al., 1995).

3.7 Biometria

A biometria dos peixes foi feita medindo seu comprimento total e padrão (Figura 4). O comprimento padrão é utilizado quando há dano nas nadadeiras caudais, por canibalismo dentro do próprio recipiente de experimentação ou por acidente quando o animal é retirado diretamente da natureza. Assim, torna-se possível a padronização dos resultados morfométricos finais.

A biometria foi feita com régua de plástico tão logo a anestesia irreversível do animal foi efetuada.

Figura 4: Medição do comprimento total e comprimento padrão em *Trematomus newnesi*.

FONTE: (VIVAI, 2011)

3.8 Processamento dos materiais biológicos obtidos

Para as análises histológicas foram retirados os dois primeiros arcos branquiais. O material foi lavado com McDowell gelado durante o processo de retirada para evitar acúmulo de sangue sobre as lamelas. Em seguida foram colocados em “vials” com o fixador McDowell gelado (MCDOWELL; TRUMP, 1976) (fixador a base de glutaraldeído 1% e paraformaldeído 4% em tampão fosfato pH 7.4, (MEYER; LEASE; BERGMAN, 2000), posteriormente mantidos em temperatura ambiente (0 °C) nesse fixador, até o processamento, por 24 h.

Para a confecção das lâminas histológicas, os arcos branquiais, quando muito grandes, foram retirados com o auxílio de um bisturi, procurando-se manter a integridade das lamelas. Tal procedimento foi necessário para que o material cartilaginoso dos arcos não danificasse as navalhas de vidro utilizadas para o corte.

Após a retirada do material do fixador, este foi em seguida transferido para o álcool 70% por pelo menos 24 horas, em seguida foi realizada a seguinte desidratação alcoólica:

- a) álcool 80% - uma hora/ álcool 95% - uma hora/ álcool 95% - uma hora;
- b) mistura de historesina e álcool 1:1 (50%) de cada – 4 horas;
- c) historesina pernoite – na qual o material foi mantido para penetração da historesina.

Para a microscopia de luz o material foi incluído em historhistoresina (Glicol Metacrilato) (JUNQUEIRA, 1995). A historesina utilizada foi a Historesina da LEICA® (Wetzlar, Hessen, Alemanha) e o procedimento de inclusão do material foi realizado conforme indicado pelo fabricante.

O material foi emblocado (historesina + endurecedor na proporção de 1:0,13), sendo colocado para secar em estufa a 40 °C até que a historesina estivesse completamente polimerizada por calor. Depois, cortes histológicos de 1 a 3 µm de espessura foram obtidos com micrótomo Jung® (Spencer, Buffalo, New York, USA) e dispostos em lâminas de vidro. Depois foram corados com Azul de Toluidina e Fucsina (brânquias e fígado); hematoxilina e eosina (fígado); PAS (Periodic acid-Schiff, segundo protocolo padrão) (brânquias e fígado); Rosenfeld (brânquias e fígado). Após a secagem, foi colada uma lamínula cada lâmina. A seguir as lâminas foram fotografadas em fotomicroscópio zeiss ICS Standard 25 (Zeiss, Alemanha) tanto no laboratório de Histofisiologia Evolutiva quanto no laboratório de Anatomia Microscópica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina Veterinária (FMVZ-USP), com um dispositivo de captura de imagem Zeiss AxioVision 4 (Zeiss, Alemanha) acoplado em conjunto ótico. Foram utilizadas objetivas acoplanares de 10x, 40x e 100x (Zeiss, Alemanha). As fotos foram então postas no programa de análise de imagens ImageJ® (versão Java 64-bit para plataforma Windows®) (National Institute of Health, Federal Government, USA).

3.9 Análise

3.9.1 Células de bastonetes (RCs)

As células de bastonetes foram contadas nas brânquias, por causa da grande exposição direta destes órgãos ao meio externo, em 10 campos de cada tratamento. Foram feitas cinco lâminas de cada tratamento (concentração/dia). Suas características foram analisadas no supracitado programa de imagens Image J.

3.9.2 Brânquias

As brânquias foram analisadas em relação às alterações estruturais que ocorreram decorrência da experimentação às águas contaminadas com fração solúvel de petróleo em diferentes concentrações. Essas alterações foram “quantificadas” de acordo com critérios estabelecidos no método de Poleksic e Mitrovic-Tutundzic (1994), os quais propuseram uma classificação para as alterações estruturais em peixes de água doce. Segundo esses autores, em um primeiro estágio, essas alterações podem ser classificadas, quanto à sua localização e tipo, em cinco grupos principais (Tabela 1).

Além disso, como um segundo critério, os autores determinaram mais três estágios, baseados na severidade das lesões, que indicaria a capacidade de recuperação das brânquias após a retirada do estímulo que provocou as alterações. O primeiro estágio representa alterações que facilmente são corrigidas, ou seja, após o término do estímulo estressante a reconstrução da estrutura normal das brânquias e de suas funções pode ocorrer. No segundo estágio as alterações levam a um comprometimento das funções do tecido branquial, mas ainda são passíveis de recuperação, se as lesões não ocorrerem em grandes áreas ou se o estímulo não for suficientemente longo. Já o terceiro estágio representa alterações irreversíveis, que mesmo com a melhora das condições ambientais, podem provocar danos às funções vitais das brânquias, podendo levar à morte do indivíduo.

Tabela 1: Alterações na estrutura branquial passíveis de observação e notação segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic

Alterações histológicas	Estágio
a) Hipertrofia e hiperplasia do tecido respiratório	
Hipertrofia das células epiteliais	I
Adelgamento epitelial	I
Deslocamento ou elevação das células do epitélio	I
Ruptura epitelial	II
Hiperplasia das células epiteliais na base das lamelas secundárias	I
Hiperplasia das células epiteliais ao longo das lamelas secundárias	I
Fusão parcial (na base ou no topo) das lamelas secundárias	I
Fusão completa de algumas lamelas secundárias	I
Fusão completa de todas as lamelas secundárias	II
Degeneração celular	II
Infiltração de leucócitos no epitélio branquial	I
b) Alterações nas células mucosas e cloreto	
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células mucosas	I
Presença de células mucosas nas lamelas secundárias	I
Hipertrofia e/ou hiperplasia das células cloreto	I
Presença de células cloreto nas lamelas secundárias	I
c) Alterações nos vasos sangüíneos lamelares	
Dilatação dos capilares	I
Desarranjo dos capilares	I
Congestão vascular	I
Hemorragia causada por ruptura de capilares	II
Aneurisma lamelar	II
d) Estágio terminal	
Fibrose	III
Necrose	III
e) Parasitas branquiais	
Presença de parasitas	I

FONTE: (POLECSIC; MITROVIC-TUTUNDIZC, 1994).

Baseando-se nesses dois critérios, estes autores desenvolveram uma fórmula na qual assumem empiricamente que a cinética das alterações observada tem um crescimento exponencial. Por essa razão determinaram valores correspondentes para cada um dos três estágios de alterações (Tabela 1):

- a) (a) para o primeiro estágio: 10^0 (x1);
- b) (b) para o segundo estágio: 10^1 (x10);
- c) (c) para o terceiro estágio: 10^2 (x100);

A fórmula proposta, que permite quantificar essas alterações, e que será adaptada às necessidades deste trabalho é, a saber:

$$I = \sum_{i=1}^{14} a_i + 10 \sum_{i=1}^5 b_i + 10^2 \sum_{i=1}^2 c_i$$

Onde:

- a) I = o grau de alterações em uma única brânquia de peixe;
- b) a = primeiro estágio de alterações;
- c) b = segundo estágio de alterações;
- d) c = terceiro estágio de alterações.

O cálculo de “ I ”, ou índice de alterações histológicas (IAH), torna possível a comparação do grau de alterações teciduais e, um grande número de peixes em diferentes situações de poluição, e pode permitir a correlação da intensidade das alterações encontradas com a intensidade da poluição à qual o animal está exposto. Poleksic e Mitrovic-Tutundzic estabeleceram relações entre os valores de I e os efeitos no órgão (tabela 2).

Tabela 2: Correlação dos valores de I e os efeitos na brânquia segundo Poleksic e Mitrovic-Tutundzic:

Valores de I	Efeitos
0-10	Brânquias normais funcionalmente
11-20	Brânquias com alterações leves a moderadas
21-50	Brânquias com alterações moderadas a extremas
>100	Dano irreparável nas brânquias

FONTE: (POLECSIC; MITROVIC-TUDUNDZIC, 1994)

3.9.3 Fígado

Para o fígado dos peixes *Trematomus newnesi* também foi calculado o Índice de Alterações Histológicas proposto por Polecsic e Mitrovic-Tutundzic (Tabela 3). No entanto, as alterações propostas pelos autores a serem observadas seguiu os seguintes critérios:

Tabela 3: Alterações na estrutura hepática passíveis de observação e registro segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic

Alterações histológicas	Estágio
a) Alterações dos hepatócitos	
Desarranjo dos cordões hepáticos	I
Perda ou atipia do contorno celular	I
Perda ou atipia do contorno nuclear	I
Aumento do volume celular	I
Aumento do volume nuclear	I
Atrofia nuclear	II
Intensa vacuolização citoplasmática	I
Vacuolização nuclear	II
Diminuição da frequência relativa de ocorrência de núcleos	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Rompimento celular	II
Diminuição do glicogênio	I
Estagnação biliar	I
b) Alteração dos vasos sanguíneos	
Aumento da frequência relativa de vasos sanguíneos	I
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
Aumento do volume relativo dos vasos	I
c) Alterações nos canalículos biliares	
Degeneração dos canalículos biliares	II
d) Estágio terminal	
Necrose (focal ou total)	III

FONTE: (POLECSIC E MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994)

Assim como nas brânquias, os autores também utilizam o mesmo padrão de correlação entre os valores de I e os efeitos no órgão (tabela 4).

Tabela 4: Correlação dos valores de I e os efeitos no fígado segundo Polecsic e Mitrovic-Tutundzic:

Valores de I	Efeitos
0-10	Fígado normal funcionalmente
11-20	Fígado com alterações leves a moderadas
21-50	Fígado com alterações moderadas a extremas
>100	Dano irreparável no fígado

FONTE: (POLECSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994)

3.9.4 Valor Médio de Avaliação (VMA)

O Valor Médio de Avaliação foi um critério proposto por Schwaiger et al (1997) é calculado a partir do grau de severidade da lesão. Ele é aplicado juntamente ao Índice de Alterações Histológicas. Partindo de uma análise semi-quantitativa, chega-se a 3 graus distintos de estado de órgão: no grau 1 os órgãos são considerados sem alterações patológicas; grau 2 os órgãos são considerados como tendo alterações patológicas leves a moderadas, enquanto o grau 3 em diante é representativo de órgãos com patologia severa a extensa.

O Valor Médio de Avaliação foi analisado tanto para as brânquias para o fígado.

A junção de ambas as metodologias acima mencionadas – Índice de Alterações Histológicas e Valor Médio de Avaliação – permite uma avaliação mais densa acerca das alterações teciduais⁹.

⁹ Índices de Polecsic (1994) e Mitrovic-Tutundzic, Schwaiger et al (1997).; Estes índices foram produzidos com base na fisiologia de peixes dulcícolas. Há, no momento, escassez de trabalhos com animais marinhos em que são utilizados tais procedimentos de análise.

3.9.5 Sangue¹⁰

3.9.5.1 *Fixação das amostras*

Para as coletas de sangue foram utilizadas agulhas e seringas de insulina, que serão por sua vez inseridas no Ducto de Cuvier, ou veia cardinal comum, através da abertura opercular. As amostras foram então pingadas em lâminas limpas, espalhadas com auxílio de uma lamínula, na forma de esfregaços, e deixadas para secar ao ar a temperatura ambiente. Foi utilizado metanol absoluto por 10 minutos para a fixação das células que, após serem novamente secas ao ar, foram coradas em Giemsa 10%, em água destilada, por 20 minutos.

3.9.5.2 *Contagem de micronúcleos¹¹ e outras anormalidades nucleares eritrocitárias.*

Todas as lâminas foram codificadas para que as análises ocorressem de forma aleatória, e então analisadas ao microscópio sob imersão em óleo, com aumento de 1000x. Apenas eritrócitos maduros, intactos e com membrana nuclear e celular evidenciadas foram considerados.

Para a identificação de micronúcleos (Mn) foi levada em conta a descrição de Mersh et al (1996). Sendo assim, foram considerados Mn as inclusões citoplasmáticas que se apresentavam como um pequeno corpo não-refringente, esférico e com contorno definido, de cor, textura e forma semelhante à do núcleo principal, porém com diâmetro entre 1/10 e 1/3 do mesmo.

Para a classificação das outras anormalidades nucleares eritrocitárias foi seguida a descrição de Pacheco; Santos (1997), que as denomina como núcleo reniforme (K), que apresenta forma semelhante a um rim, núcleo lobado (L), no qual o núcleo é dividido em lobos, e núcleo segmentado (S), que apresenta o núcleo separado por uma constrição, em partes não necessariamente do mesmo tamanho.

¹⁰ **Índices hematológicos.** Os índices hematológicos (não apenas histológicos/ celulares como anomalias eritrocitárias e micronúcleo, como bioquímicos) são amplamente utilizados em estudos com toda a sorte de vertebrados, principalmente peixes e mamíferos, com vasta aplicação em peixes de clima polar.

¹¹ **Micronúcleo.** Mesmo sendo esta técnica aplicada numa vasta gama de animais, sua análise em mamíferos diferencia-se dos outros animais pelo tipo celular observado: no caso dos mamíferos, os micronúcleos são observados nos leucócitos, uma vez que seus eritrócitos são anucleados.

Para a contagem dos Mn e das ENA foram analisados cerca de 2000 eritrócitos maduros por lâmina, sendo duas lâminas de cada peixe, resultando em um total de 4000 eritrócitos por peixe, como sugeridas por Metcalfe (1988). Foram calculadas as freqüências de ocorrência das ENA e Mn e também obtidas as médias entre as duas lâminas de cada indivíduo.

Para o cálculo das freqüências (%) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

- a) Freqüência de Mn = $f(\text{Mn}) = \text{Mn}/2000$;
- b) Freqüência de K = $f(\text{K}) = \text{K}/2000$;
- c) Freqüência de L = $f(\text{L}) = \text{L}/2000$;
- d) Freqüência de S = $f(\text{S}) = \text{S}/2000$;
- e) Freqüência de ENA = $f(\text{ENA}) = (\text{Mn} + \text{L} + \text{S} + \text{R})/2000$.

Onde Mn, K, L e S = Número de micronúcleos, reniformes, lobados e segmentados encontrados em 2000 eritrócitos examinados.

3.9.6 Fixação e processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Para o estudo ultra-estrutural das brânquias, a fixação foi feita em solução gelada de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0.1M de pH 7,2 a 0 °C (HAYAT, 1981), com fragmentos de cerca de 1 a 2 mm de espessura. Em seguida foi feita a descalcificação em ácido fórmico. A pós-fixação foi realizada com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato com sacarose por 2 horas a 4 °C. Em seguida, os fragmentos foram colocados por 24 horas em solução de acetato de uranila a 0.5% em água destilada com sacarose a 10,56 g por 100ml, a 4 °C. Depois da desidratação em soluções alcoólicas crescentes de 70% a 100%, seguiram-se duas passagens pelo óxido de propileno puro durante 20 minutos cada, infiltração com óxido de propileno mais historesina básica (Araldite) em partes iguais, durando 12 horas, com agitação em temperatura ambiente. Na seqüência as peças foram incluídas em historesina pura a 37 °C, depositadas em moldes e levadas à estufa a 70 °C, durante 5 dias. Para a microtomia de corte semi-fino, da ordem de 0,5 µm de espessura, foi utilizado o ultramicrotomo LKB Porter Blum MT-1; para cortes ultrafinos de aproximadamente 70 nm foi utilizado o ultramicrotomo LKB Porter Blum MT 2, cujos cortes foram coletados em telas de cobre, corados com acetato de uranila a 2% em água destilada durante 1 hora e lavados em água destilada (REYNOLDS, 1963) durante 30 minu-

tos. As análises das telas e obtenção de micrografias eletrônicas foram realizadas com o microscópio eletrônico (JEOL-100 CX-II).

3.10 Análise dos resultados obtidos

Para brânquias e fígado, os dados obtidos foram avaliados em função das médias e desvios padrões obtidos por análise de dados estatísticos ANOVA no software GraphPad In Stat[®] (GraphPad Software, Inc, La Jolla, San Diego, California, USA). As médias foram comparadas pelo teste de Turkey, com diferenças consideradas significativas apenas quando $p < 0,05$.

Para o teste de micronúcleo e outras anomalias eritrocitárias, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA $p < 0,05$), no software Microsoft Excel[®] (Microsoft Corporation, Washington DC, USA).

Todos os gráficos foram plotados no programa Microsoft Excel[®].

4 RESULTADOS

4.1 Biometria

A média da biometria dos peixes demonstrou que o peso ficou em $2,5 \pm 3,5$ g, o comprimento total manteve-se em $6,9 \pm 7,7$ cm, enquanto que o comprimento padrão ficou em $6,3 \pm 6,7$ cm. Não houve significância estatística.

4.2 Células de bastonetes

A contagem das RCs determinou uma média de $56 \pm 21,82$ RCs para o período de quinze dias a 20% de petróleo, enquanto que a média dos 15 dias a 10% resultou em $36 \pm 21,30$ RCs, a de 15 dias a 0% teve uma média de $25 \pm 7,16$ RCs, enquanto a média dos lotes de 10 dias resultou em $38,75 \pm 4,27$ (20%), $27,33 \pm 7,02$ (10%) e $38 \pm 10,44$ (0%). Aos 5 dias de experimentação, foi contada uma média de $29 \pm 10,23$ RCs a 20%, $15,5 \pm 5,5$ a 10% e $30,67 \pm 8,32$ a 0%. (Figura 5). Não houve diferença estatística ($p < 0,05$).

Portanto, houve um grande aumento em 15 dias a 20% de FSA, mesmo assim não significativo em termos estatísticos.

As células de bastonetes foram encontradas tanto em agrupamentos no topo de lamelas primárias (figuras 6 e 7), como ao longo de lamelas secundárias (Figura 8). Todas as células encontradas nas lamelas secundárias tinham a porção basal voltada para o interior da lamela (o núcleo é basal para que a célula possa ter espaço para comportar as estruturas dos bastonetes, o que guarda bastante semelhança com as células de muco) e a sua parte apical voltada para a parte externa do órgão. Figura e apical que as células fazem a extrusão dos bastonetes. Além disso, todas elas possuíam a cápsula característica a essas células (Figura 9).

Figura 5: Média da contagem de células de bastonetes

Contadas em cada período e concentração, de 15 dias, 10 dias e 5 dias, a 20% (0,8 ppm), 10% (0,4 ppm) e 0% (0ppm)

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 6: Corte histológico em historesina de uma lamela primária de *T. newnesi*.

Células de bastonetes encontradas a 15 dias a 20% de FSA, localizadas na ponta de uma lamela primária. Quando encontradas dessa maneira, essas células não foram consideradas na quantificação. (Toluidina-fuccina, barra de escala = 10μm)

FONTE: (VIVAI, 2011)

Figura 7: Corte histológico em historesina de uma lamela primária de *T. newnesi*.

Células de bastonetes encontradas a 15 dias a 0% de FSA (controle), localizadas na ponta de uma lamela primária. Quando nessa posição, as células não foram consideradas na quantificação. (Toluidina-fuccina, aumento de 1000x)

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 8: Corte em historesina mostrando de duas lamelas secundárias projetando-se a partir de uma lamela primária.

T. newnesi exposto por 15 dias a 20% de FSA. Notar as células de bastonetes perto da base dessas lamelas secundárias, local onde foram consideradas na quantificação (setas). (Toluidina-fuccina, barra de escala 10μm)

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 9: Eletron-micrografias de transmissão de lamelas secundárias das brânquias de *T.newnesi* expostos a 20% de FSA

Observam-se diferentes estágios de maturação das células bastonetes (RC), em A as pequenas vesículas não apresentam grânulos ou bastões elétron densos, em B verifica-se alguns elementos elétron densos circulares, em C são mais numerosos e alongam-se e em D os bastonetes estão formados. Notar o revestimento fibrilar dessas células (setas) (barra de escala= 5 μ m).

FONTE: (VIVAI, 2011).

4.3 Índice de Alterações Histológicas (IAH) e Valor Médio de Avaliação (VMA) das brânquias

A análise do IAH das brânquias foi obtida de tal forma que, a quinze dias de experimentação, a média (média $\pm$ desvio padrão) de 20% foi $29,67 \pm 5,50$; a de 10%, $30,25 \pm 12,09$, enquanto que a concentração de 0% manteve-se numa média de $18,75 \pm 3,86$. Quando analisadas as lâminas de 10 dias e exposição à fração solúvel de petróleo, foi observada a média, para 20%, de $14,50 \pm 9,03$, enquanto que o grupo a 10% manteve-se na média de $17,00 \pm 6,00$, e a concentração controle, de 0%, ficou em torno de $5,00 \pm 4,00$. A cinco dias de experimentação, os valores do IAH ficaram ligeiramente abaixo dos outros dois períodos, uma vez que a 15 dias de experimentação a 20% de FSA, a média obtida foi de $16,25 \pm 5,25$; enquanto a média da con-

centração de 10% (0,4 ppm) foi obtida como sendo $17,25 \pm 10,78$. Na análise do controle (0% de FSA) neste período, a média manteve-se em $12,00 \pm 9,00$ Figura 10).

Figura 10: Médias dos Índices de Alterações Histológicas encontrados nas brânquias de *T. newnesi* expostos às diferentes concentrações de FSA

FONTE: (VIVAI, 2011).

Tratando-se das brânquias, a média do VMA, calculado a partir da tabela do Índice de alterações histológicas (IAH), resultou em $1,26 \pm 0,05$ (5 dias, 20% FSA); $1,35 \pm 0,11$ (5 dias, 10% FSA); $1,17 \pm 0,03$ (5 dias, 10% FSA). $1,27 \pm 0,12$ (10 dias, 20% FSA); $1,29 \pm 0,10$ (10 dias, 10% FSA); $1,12 \pm 0,04$ (10 dias, 0% FSA). O lote de 15 dias obteve média de $1,40 \pm 0,11$ (20%); $1,36 \pm 0,13$ (10%) e $1,24 \pm 0,10$ (0%) (Figura 11), sem apresentar diferença estatística significativa.

Figura 11: Valor médio de Avaliação (VMA) das brânquias de peixes antárticos *T. newnesi* expostos a diferentes concentrações de FSA

FONTE: (VIVAI, 2011)

As alterações mais comumente encontradas foram hipertrofia das células que compõe o epitélio respiratório e o deslocamento desse epitélio das lamelas à qual pertencem. Não obstante essas alterações lamelares, também foram encontradas em menor severidade degeneração do epitélio (Figura 12D). Em raros e esparsos casos foram encontrados aneurismas (Figuras A e B) e células de muco localizadas ao longo de lamelas secundárias (Figura 12C), além de deslocamentos do epitélio (Figuras 12F e 14), mas não células de cloreto, e apenas uma célula fagocítica contendo um núcleo picnótico fagocitado (Figuras 13).

Não foi encontrada nenhuma alteração de estágio terminal em nenhum animal dos grupos expostos ao FSA, nem dos controles.

O cálculo do IAH da brânquia de *T. newnesi* determinou que apenas os peixes expostos por 15 dias a 20% e 10% de fração solúvel de petróleo possuem um índice indicando alterações moderadas a graves, enquanto os peixes expostos por períodos menores (excetuando-se o controle de 10 dias, cuja classificação mantém-se como órgão funcionalmente normal), estão na faixa de alterações leves a moderadas.

O Valor Médio de Avaliação das brânquias manteve-se abaixo de 1,5 em todos os períodos e concentrações, delimitando assim o Grau 1, determinando que estes órgãos não tiveram alterações patológicas. O valor ficou ligeiramente mais alto nos períodos tratados com FSA do que nos controles, mas sem diferença estatística significativa.

Figura 12: Fotomicrografias de cortes histológicos de brânquias de *T. newnesi* em historesina.

Alterações na estrutura branquial. Em (A), de um indivíduo exposto por 5 dias a 20% de FSA, e (B), 15 dias a 10% de FSA, é possível observar aneurismas (setas). Em (C), de um animal exposto por 10 dias a 10% de FSA, observa-se a presença de células de muco ao longo de lamelas secundárias (setas retas) e hipertrofia de células do epitélio respiratório (setas curvas); enquanto em (D) (15 dias, 20% de FSA) é observada degeneração do epitélio respiratório (colchetes). A título de comparação, em (E), de um controle de 10 dias de experimento, são indicadas por seta lamelas morfologicamente normais, o que não acontece em (F), onde se vêem deslocamentos do epitélio respiratório das respectivas lamelas secundárias (setas). (toluidina-fuccina, barra de escala 10 µm)

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 13: Eletron-micrografia de transmissão de uma lamela secundária da brânquia de *T.newnesi*.

Exposição a 20% de FSA, na qual se observa uma célula fagocítica contendo, em seu citoplasma, outro tipo celular com núcleo picnótico. (barra de escala= 10 μ m).

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 14: Eletron-micrografia de transmissão de uma lamela secundária da brânquia de *T.newnesi*

Exposição a 20% de FSA, na qual se observa um capilar congestionado, um processo de diapedese (seta vermelha) e um descolamento epitelial (seta preta) (barra de escala= 10 μ m).

FONTE: (VIVAI, 2011).

4.4 Índice de alterações Histológicas (IAH) e Valor de Alteração Média (VMA) do fígado

Os valores do IAH do fígado obtidos (média $\pm$ desvio padrão) foram $22,5 \pm 16,94$ (15 dias, 20% FSA); $21,25 \pm 8,8$ (15 dias, 10% FSA); $22,33 \pm 10$ (15 dias, 0% FSA); $21,25 \pm 10,93$ (10 dias, 20% FSA); $17,75 \pm 13,72$ (10 dias, 10%); $23 \pm 1,41$ (10 dias, 0% FSA); $32 \pm 8,75$ (5 dias, 20% FSA), $35,5 \pm 12,34$ (5 dias, 10% FSA), $22,33 \pm 9,5$ (5 dias, 0% FSA). Não houve diferença estatisticamente significativa. (Figura 15).

Figura 15 : Médias do Índice de alterações histológicas e desvio padrão do fígado dos peixes *T. newnesi* expostos a diferentes concentrações de FSA

FONTE: (VIVAI, 2011).

Os valores das médias do VMA hepático foram $1,36 \pm 0,16$ (5 dias, 20% FSA), $1,34 \pm 0,08$ (5 dias, 10% FSA); $1,22 \pm 0,02$ (5 dias, 0% FSA). $1,24 \pm 0,18$ (10 dias, 20% FSA); $1,3 \pm 0,05$ (10 dias, 10% FSA); $1,3 \pm 0,07$ (10 dias, 0% FSA). $1,4 \pm 0,12$ (15 dias, 20% FSA), $1,29 \pm 0,09$ (15 dias, 10% FSA); $1,17 \pm 0,14$ (15 dias, 0% FSA). Não houve significância estatística significativa (Figura 16).

Figura 16: Valor Médio de Avaliação (VMA) e desvio padrão do fígado dos peixes antárticos *T. newnesi* expostos a diferentes concentrações de FSA

FONTE: (VIVAI, 2011).

As alterações mais observadas na análise hepática que constam na tabela do IAH foram as hipertrofias nucleares e hiperemias (Figura 17). Outras alterações, tais como desarranjo dos cordões hepáticos (o arranjo em forma de cordão dos núcleos dos hepatócitos), foram observadas de maneira menos recorrente.

Figura 17: Fotomicrografias ao microscópio de luz de cortes de fígado em historesina

Em (A), coloração por toluidina e fuccina demonstra menos clareza de contraste entre núcleo e citoplasma do que em (B), este corado em hematoxilina e eosina, de forma a ser possível observar um cordão hepático (colchete). Em (C) observa-se núcleos hipertrofiados (setas mais finas) em comparação aos núcleos vizinhos, e também hiperemia (seta mais grossa) (hematoxilina-eosina). Em microscopia de fase foi possível ver uma grande vacuolização do tecido hepático (D) (hematoxilina-eosina, microscopia de fase). Barra de escala 10 µm.

FONTE: (VIVAI, 2011)

Os critérios tomados por parte do fígado mostram que, excetuando-se o período de 10 dias a 10%, todos os períodos testados mostraram-se como órgãos com alterações de moderadas a graves.

O Valor Médio de Avaliação do fígado, assim como as brânquias, se manteve abaixo de 1,5 em todos os períodos e concentrações, sendo determinado, portanto, como Grau 1, ou seja, órgão sem alterações patológicas. No período de 10 dias houve uma pequena diminuição no VMA da concentração de 20%.

4.5 Frequência de Micronúcleo e outras anormalidades eritrocitárias

Eritrócitos maduros de *T. newnesi* foram encontrados como o tipo celular predominante nas lâminas analisadas. Foi verificada a presença de micronúcleos em todos os grupos teste e controle, assim como de anormalidades nucleares L e K (Fig. 24C e 24E, respectivamente), que foram os componentes predominantes nos eritrócitos da espécie estudada. A anormalidade S não foi encontrada nos grupos expostos a 0% e 10% de FSA do petróleo por 5 dias, bem como no grupo exposto a 20% durante 15 dias.

Os resultados dos experimentos estão ilustrados nas figuras 18 a 23. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (Kruskal-Wallis ANOVA, $p > 0.05$) entre as frequências de Mn, K, L, S e ENA encontradas para os peixes expostos às três diferentes concentrações de FSA do petróleo nos períodos de exposição 5 e 10 dias.

No experimento decorrido em 15 dias (Fig. 20), o grupo controle (0%) apresentou frequências significativamente maiores ($p < 0,05$) de L e ENA do que o grupo exposto a 10%, e frequências maiores, porém não significativas, do que o grupo exposto à 20%. O grupo exposto a 10% mostrou valores ligeiramente maiores, apesar de não estatisticamente diferentes, de frequências de ENA, K e L, do que o grupo exposto à maior concentração. Para o parâmetro micronúcleo, as frequências encontradas no grupo exposto a 20% superaram as do grupo controle, porém sem significado estatístico.

Do ponto de vista descritivo, em 5 dias de exposição (Figura 18) é possível observar que os grupos teste superaram os grupos controle nas frequências de todos os parâmetros. O grupo exposto a 10% foi o que apresentou as maiores frequências

de lesões, com expressão de Mn e S, que apareceram maiores nos grupos expostos a 20% de FSA do petróleo. Em 10 dias de exposição (Figura 19), as freqüências de lesões do grupo controle mostraram-se maiores que as dos grupos teste para L, K e total de ENA. Os grupos teste superaram os controles apenas no parâmetro Mn, onde os peixes expostos a 10% apresentaram os maiores valores.

Para permitir a observação da influência dos períodos de exposição nas freqüências de micronúcleos e outras anormalidades nucleares eritrocitárias, os resultados foram reorganizados de modo a comparar peixes expostos nas mesmas concentrações, ou seja, tendo como variável o período de exposição, como mostram as figuras 21,22 e 23. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nessa comparação.

Esta análise, entretanto, revelou que as freqüências de ENA, K e L dos grupos controle mantidos em água do mar durante 15 dias superaram as dos grupos mantidos durante 5 dias, e as freqüências de L também foram superiores as do grupo mantido durante 10 dias. Tais diferenças não se revelaram estatisticamente significativas. É possível observar uma tendência de aumento de freqüências de anormalidades, em função do aumento do período de exposição, mesmo sendo estes, os grupos controles.

Para os grupos expostos a 10% não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os três períodos de exposição, assim como para os grupos expostos a 20%. Entretanto, é possível observar que, para 10% de exposição, as freqüências de L e ENA diminuíram com o prolongamento da exposição, e também que as maiores freqüências de K foram encontradas no menor período de exposição. Para os grupos expostos a 20%, as freqüências de L, K e ENA tendem a diminuir com o prolongamento da exposição para 15 dias, a freqüência de Mn, entretanto, tende a aumentar com tal prolongamento.

Figura 18: Frequência de células com micronúcleos, núcleo lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidades nucleares eritrocitárias totais.

Peixes expostos a 0%, 10% e 20% de FSA do petróleo, durante 5 dias.

FONTE: (VIVAI, 2011)

Figura 19: Frequência de células com micronúcleos, núcleo lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidades nucleares eritrocitárias totais.

Peixes expostos a 0%, 10% e 20% de FSA do petróleo, durante 10 dias.

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 20: Frequência de células com micronúcleos, núcleo lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidades nucleares eritrocitárias totais.

Peixes expostos à 0%, 10% e 20% de FSA do petróleo, durante 15 dias.

* diferença significativa entre o grupo controle e o grupo exposto a 10% ($p = 0,029$), nos parâmetros L e ENA.

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 21: Frequência de células com micronúcleos, núcleo lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidades nucleares eritrocitárias totais.

Peixes expostos à 0% de FSA do petróleo, durante 5, 10 e 15 dias.

FONTE: (VIVAI, 2011).

Figura 22: Frequência de células com micronúcleos, núcleo lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidades nucleares eritrocitárias totais.

Peixes expostos a 10% de FSA do petróleo, durante 5, 10 e 15 dias.

FONTE: (VIVAI, 2011)

Figura 23: Frequência de células com micronúcleos, núcleo lobado, núcleo reniforme, núcleo segmentado e anormalidades nucleares eritrocitárias totais.

Peixes expostos à 20% de FSA do petróleo, durante 5, 10 e 15 dias.

FONTE: (VIVAI, 2011)

Figura 24: Fotomicrografia de luz de extensão sanguínea mostrando eritrócitos de *Trematomus newnesi*

Núcleo normal (A), micronúcleo (B), núcleo lobado (C), núcleo segmentado (D) e núcleo reniforme (E).

(FONTE: VIVAI, 2011).

5 DISCUSSÃO

O IAH do fígado encontrou alterações relativamente mais severas, sendo que a maioria dos experimentos manteve-se na faixa de 21 a 50, protocolado como sendo órgãos com alterações de moderadas a graves, com a exceção sendo o teste com 10 dias a 10 % de FSA. No entanto, apenas no período de 10 dias houve uma pequena diminuição no VMA da concentração de 20%.

Interessantemente, a análise das brânquias demonstrou um IAH mais brando do que o fígado, estando a maioria de seus resultados na faixa de 11 a 12, mantendo-se na faixa de alterações leves a moderadas, tendo sua exceção centrada nos testes com FSA a quinze dias (10 e 20%) e, embora o teste estatístico tenha demonstrado não haver diferença, a escala do IAH demonstra que ambos passaram da faixa considerada como alterações leves, mantendo-se em moderadas/graves. Mas só nas brânquias o IAH aumentou durante os períodos, enquanto que no fígado houve uma inversão. Assim, pode-se inferir que, nas brânquias, o prolongamento do tempo de exposição ao FSA poderia ter aumentado os valores do IAH em cada período testado. É intrigante o fato das brânquias terem o IAH menor do que o fígado, já que as brânquias são o entreposto do meio externo para o meio interno do peixe e, assim, serem atingidas primariamente por compostos nocivos presentes na água.

Os controles branquiais de 10 e 15 dias tiveram um IAH alto, devido provavelmente ao fato de terem sido capturados no ambiente natural, e não em cativeiro. Laurent e Perry (1990) explicitam que a adaptação de um organismo implica num novo estado onde a brânquia está totalmente ou parcialmente conservada; nesses casos, mudanças morfológicas são consideradas adaptativas. Adicionalmente, o resultado final de uma adaptação morfológica é um comprometimento no qual uma função é sacrificada em detrimento de outra. Portanto, é possível que o FSA não tenha sido muito efetivo sobre as brânquias testadas, visto que o IAH dos testes e dos controles resultou sem diferença estatística; e o IAH tenha sido efetuado em órgãos morfolologicamente adaptados ao ambiente. Sob esse ponto de análise, é interessante salientar que a aparente ineficiência da fração solúvel de petróleo nas brânquias pode advir de uma pré-adaptação do *Trematomus newnesi* ao ambiente supostamente contaminado, como é sustentado por Phan et al., 2006.

Bargagli (2008) sustenta que nos últimos anos tem havido indícios de que a Antártica é atingida por poluição, embora este continente ainda tenha uma aura de “continente intocado” pelos processos antropogênicos.

Em se falando das alterações em de forma isolada, a maioria dos grupos observados apresentou, em diferentes graus, deslocamento do epitélio e degeneração das células epiteliais das lamelas secundárias. O deslocamento é caracterizado pela separação do epitélio respiratório da lamela secundária. Esse deslocamento permite que solutos, como a água circundante, penetre neste espaço, o que pode levar a edemas. Sobre esse caso, Mallat (1985) explica que esta alteração produz-se tal qual um mecanismo de distanciamento de difusão entre a água e o sangue. No entanto, essa provável adaptação interfere na eficiência das trocas gasosas e no transporte iônico. Mas ao serem encontradas também quando no grupo controle, esta observação é corroborada por Hinton (1992), que descreve o fato de que alterações como deslocamento epitelial, hiperplasia do epitélio e fusão lamelar (essa última não foi encontrada em nenhum grupo analisado) podem ser causadas por uma variedade de estressores, o que novamente suscita a pensar o ambiente antártico como tendo pontos alterados.

Relembrando-se a estrutura de uma lamela secundária, especial atenção deve ser dada às células pilares que compõe parte da estrutura dos vasos sanguíneos pelos quais os eritrócitos passam para que ocorra sua interação com o epitélio respiratório. Algo que salta aos olhos quando há uma primeira análise branquial histopatológica é um aneurisma lamelar, cuja causa é a morte das células pilares e acarreta o desaparecimento da estrutura original, com o conseqüente acúmulo de células sanguíneas e alteração do fluxo sanguíneo (HEATH, 1987; HEUVEL et al., 2000). Alguns trabalhos descrevem aneurismas em animais frente a metais pesados (THOPHON et al., 2003), como cobre (KARAN et al., 1998).

Houve uma alteração comum a todos os peixes de todos os grupos amostrais, todos em grande quantidade: a hipertrofia do epitélio respiratório nas lamelas secundárias. Segundo Mazon; Cerqueira e Fernandes (2002) a hipertrofia das células do epitélio respiratório é uma forma de aumentar a espessura da barreira água-sangue. Normalmente a hipertrofia não aparece sem hiperplasia destas células, mas não foi encontrado indícios de hiperplasia na análise. Em todo caso, o aumento da barreira, mesmo que não advindo de uma hiperplasia é, na verdade, um aumento da

barreira poluente-sangue, numa ânsia de diminuir o máximo possível os efeitos tóxicos dos poluentes. Como houve alterações deste tipo nos animais controle, não se pode atribuir esse efeito à fração solúvel de petróleo. Na realidade, desde que a água para manutenção dos animais durante o período testado e os animais foram coletados muito perto da Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz, e Bargagli (2008) fala sobre a ameaça das atividades das Estações de pesquisa à manutenção de um ambiente totalmente limpo, as alterações encontradas também nos animais controle concordam com os autores que citam múltiplas fontes poluidoras para uma mesma alteração.

O IAH maior do fígado em comparação com as brânquias condiz com o seu papel de metabolizador de substâncias estranhas ao corpo. Os índices de alteração altos nos indivíduos controle podem ter parte no que Bargagli (2008) explicita sobre a bioacumulação de metais pesados (principalmente o cádmio) na cadeia alimentar antártica, como o caso de algas, krills e zooplanktons, principais alimento de muitos animais marinhos, tais como os *T. newnesi*. O autor ainda cita o fato de que o continente não possui rios, dificultando, assim, a drenagem de poluentes para o interior do continente. Mais que isso, o figura demonstra que, se realmente o FSA teve efeito sobre o fígado, então o foi numa fase mais aguda (5 dias), já que nos períodos posteriores de 10 e 15 dias o IAH manteve-se mais baixo que nos de 5 dias. Ao se observar a relação entre os três períodos no tocante às concentrações, visivelmente a diferença entre testes e controle é mais evidente no período de 5 dias. Entretanto, a pequena diferença observada no VMA hepático contrapõe esta análise.

O design do IAH proposto por Polecsic e Mitrovic-Tutundzic em 1994 e sua posterior melhora por Schwaiger et al. em 1997 com o VMA teve como padrão animais dulcícolas de clima tropical e/ou temperado. Não foi encontrado registro na literatura de utilização deste índice para organismos de clima desértico polar, e novos estudos são necessários no sentido de adequar essa metodologia a ambientes polares. Um exemplo que comprova que a adequação deste índice a ambientes diversificados geoclimatologicamente se faz necessária é a vacuolização do tecido hepático (item da tabela do IAH). Esta maior vacuolização é natural em peixes antárticos por conta das peculiaridades da difusão do oxigênio em temperaturas muito baixas. (RÖMISCH; MATHESON, 2003)

A concentração de 0,4 ppm (10%) e 0,8 ppm (20%) de fração solúvel de petróleo foi aplicada tendo como base um trabalho anterior de Borges et al (2010), que usaram a mesma concentração de FSA para observar a dinâmica de cristalóides intranucleares em amebócitos de ouriços-do-mar antárticos numa busca por um biomarcador, e observaram alguns resultados positivos quando da concentração por 0,8 e 1,2 ppm. Obviamente, a natureza de ambos, ouriço e peixe, e deve ser discriminada. A começar pelo fato de que ouriços-do-mar são animais majoritariamente sésseis e de locomoção lenta e peixes são animais em constante movimento. No entanto, o trabalho de Borges ajuda a demonstrar a possibilidade de usar organismos pluricelulares para analisar a poluição por petróleo na Antártica. Ao se cruzar o trabalho de Borges (2010) com o de Akaishi et al. (2004), observa-se uma maior credibilidade nessa possibilidade, uma vez que, neste último, os autores estressaram lambaris (*Astianax* sp.) em um período mais agudo (96 horas), e perceberam alterações em aspectos morfológicos branquiais e hepáticos em comparação com animais controle, no entanto, os animais teste foram expostos a concentrações bem maiores, chegando a 50%. A escolha de 10% e 20% utilizados no presente trabalho sobrepujou-se à idéia de um simulacro de concentrações presentes em um derramamento petrolífero imediato, e assentou-se sobre o conceito de que um biomarcador útil deve ser aquele que demonstra alterações com presença de quantidades mínimas de um dado estressor, o que determinaria não só sua validade como também a o nível de sensibilidade.

Apesar de serem exclusivas dos teleósteos, as células com bastonetes (*Rodlet cells* = RC) não são facilmente encontradas e nem sempre estão presentes em todas as espécies dessa classe de peixes. Estas células se caracterizam, principalmente, por uma densa cápsula formada por uma malha contínua de microfibrilas e por possuírem corpúsculos citoplasmáticos em forma de bastonetes ou setas que apontam para a zona apical das células (MENDONÇA, et al. 2005). As RCs foram descritas primeiramente por Thelohan (1892) como parasitas esporozoários dos peixes, e nomeadas de *Thelohani rhabdospora* por Laguesse em 1895. Em 1906 Plehn considerou as RC como células de defesa que possuem grânulos de ação endógena, refutando a hipótese de Laguesse. Ambos mantiveram sua posição, e durante o século XX, ambas as hipóteses continuaram a coexistir com variadas interpretações quanto a funções e significado dessas células (SCHMACHTENBERG, 2007). No

presente trabalho as RCs foram diagnosticadas em todo o lote amostral, tanto no grupo controle quanto nos de exposição e sem diferenças significativas quanto à quantidade, situando-se principalmente na base das lamelas primárias das brânquias, concordando com o trabalho realizado por Matthey et al. (1979) que também descreve a presença dessas células na base das lamelas primárias do teleósteo *Dicentrarchus labrax*. Dezfuli (2003) cita uma grande quantidade de RCs em peixes infectados com o copépodo *Ergasilus sieboldi* nas brânquias. Os resultados obtidos demonstram não haver diferença significativa do número de RCs entre os grupos teste e o grupo controle, em todos os períodos de experimentação. Não se pode afirmar que estes achados contrapõem os resultados obtidos por Kramer (KRAMER et al. 2005), uma vez que os indicadores mais clássicos de poluição mensurados – Índice de Alterações Histológicas (IAH), Valor Médio de Avaliação (VMA) e o teste de micronúcleo e outras anomalias eritrocitárias – não indicaram variação estatística de grupo controle para o grupo teste.

Neste experimento, as RCs só foram encontradas nas brânquias, e não no fígado e nem no sangue, embora nenhum trabalho pesquisado na literatura tenha encontrado estas células no fígado e/ou no sangue. Em alguns pontos dos cortes das brânquias, foi possível observar o que Kramer et al. (2003) chama de *clusters*: um aglomerado de RCs. Portanto não apenas estas células são visíveis de forma esparsa pelo tecido, como também em grupos, preferencialmente na extremidade externa das lamelas primárias. Uma vez que já foi possível isolar estas células com o propósito de uma análise *in vivo* de suas ações (como demonstrado em uma série de imagens publicadas na revisão publicada por Schmachtenberg (2007), entretanto ainda não houve sucesso na tentativa de cultivá-las, a existência destes *clusters* é ponto de interesse e atenção quando da tentativa de isolamento e cultivo.

Ao se analisar os fatos experimentais que circundam as RCs, pouca ou nenhuma atenção é dada ao fato dos insucessos em cultivá-las. No entanto, na discussão acerca de sua origem – endógena (produzida pelo próprio corpo, cuja ontogenia provavelmente relacionada ao rim cefálico foi observada por Mazon et al. em 2007) ou exógena (parasítica), é importante salientar esse fato. Um parasita unicelular – no caso, um provável esporozoíta – seria passível de cultivo, principalmente em meios de cultura – líquidos ou sólidos – voltados para esse grupo de microorganismos.

mos. Quando as tentativas até então falham¹², é importante reavaliar algumas teorias.

Os microorganismos antárticos possuem adaptações a nível molecular para as condições adversas que esse ambiente gélido lhes impõe. As RCs foram observadas também em outros peixes antárticos como, por exemplo, *Notothenia cooriceps* (VIANNA; FANTA; HAAPALAINEN, 2000). A hipótese exógena exigiria que estas células tivessem adaptações ao ambiente que as diferenciariam – obrigatoriamente no âmbito molecular e genético, e nem tanto no morfológico - das suas semelhantes em águas mais quentes. Embora as RCs sejam eucarióticas, a proteína anticongelante tem sido encontrada em algumas espécies de bactérias (organismos procarióticos), menos complexas em termos evolutivos do que os eucarióticos e, dessa maneira, pode-se deduzir que se as RCs forem parasitas que infestam os peixes em algum momento de seu desenvolvimento, obrigatoriamente elas teriam que produzir a proteína anticongelante para a sobrevivência no meio externo.

O presente trabalho descreve as RCs de forma inédita especificamente nas brânquias de *Trematomus newnesi*, embora já tenham sido encontradas no intestino do mesmo animal por Vianna; Fanta; Haapalainen (2000).

Os resultados encontrados por trabalhos referentes às RCs quando do estresse químico, biológico e/ou ambiental, apontam uma ligeira relação destas células com o animal estressado em comparação com o animal não estressado. Comparando-se a falta de diferença estatística entre os lotes de animais estressados e o lote dos controles, também salta aos olhos a falta de diferença estatística entre o número de RCs de todos os lotes estudados, incluindo aí o controle. É possível, portanto, que os controles também estejam alterados pelo próprio ambiente, segundo Bargagli (2008) já provavelmente aterado, e o aparecimento das células de bastonetes nesses animais não fazem mais do que contribuir para a proposição de que elas estejam ligadas à resposta frente à poluição.

¹²**Insucessos empíricos:** quando da realização de um trabalho envolvendo experimentação, nem sempre os resultados saem como o desejado e, portanto, poucos cientistas publicam suas desventuras empíricas. No caso das células de bastonetes, a menção mais clara ao fato de que ainda não se conseguiu cultivá-las dá-se em revisões especificamente sobre este tipo celular, como no caso do abrangente artigo de Schmachtenberg (2007).

Recentemente, a expressão simultânea de anormalidades nucleares eritrocitárias juntamente com micronúcleos tem recebido atenção considerável. Embora o mecanismo de formação destas ENA não tenha sido totalmente esclarecido (ÇAVAS; ERGENE-GOZUKARA 2005b), vários estudos indicam sua expressão em teleósteos em resposta à exposição a agentes genotóxicos (PACHECO; SANTOS 1997, 2001; GRAVATO; SANTOS 2002; AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ 2001).

Neste trabalho, não foram encontradas diferenças significativas nas frequências de ENA e Mn entre os grupos controle e teste, nos grupos expostos à FSA do petróleo durante 5 e 10 dias.

Investigações prévias sugerem que a expressão dos efeitos genotóxicos - como micronúcleo e ENA - pode ser mascarada por uma inibição da eritropoiese (DAS; NANDA, 1986) ou por um aumento do catabolismo dos eritrócitos (PACHECO; SANTOS, 1997). Uma alta porcentagem de células apoptóticas foi descrita em peixes marinhos expostos a efluentes de uma refinaria de petróleo (FRENZILLI et al; 2004). Este fenômeno ocorre quando o dano celular é muito intenso e os mecanismos de reparo são incapazes de resolver o problema. Durante a cinética das células sanguíneas eritrócitos são continuamente renovados, e eritrócitos danificados são eliminados mais rapidamente do organismo do que aqueles que não estão danificados, conseqüentemente o número destas células disponíveis para a análise diminui (DE FLORA et al. 1993).

A alteração de micronúcleo nos eritrócitos de peixes é um índice bastante clássico de estudo para poluentes. Com uma rápida busca na literatura, é possível verificar que os parâmetros mais utilizados para este tipo de análise são os índices hematológicos e hepáticos. Este fato nos induz à conjectura de que os índices branquiais não parecem ser tão confiáveis de análise, ou então os protocolos histológicos para esse órgão sejam insuficientes de alguma maneira (esse pressuposto não inclui parâmetros de caráter bioquímico, apenas histológicos).

Nos grupos expostos a 0% (controles) é possível observar claramente uma tendência de aumento de frequência de ENA, K e L em função do prolongamento do tempo de exposição, mesmo sem nenhum agente tóxico. É possível que este aumento esteja relacionado ao estresse sofrido durante a manipulação dos peixes. A formação de micronúcleo ocorre espontaneamente em peixes e a frequência de Mn espontâneos pode variar dependendo do método utilizado na manipulação dos ani-

mais (AL-SABTI; METCALFE, 1995). Existem fatores fisiológicos como idade, sexo, dieta, saúde e estado reprodutivo (AL-SABTI; METCALFE, 1995), susceptibilidade do indivíduo (DEPLEDGE, 1994) e temperatura (BRUNETTI et al, 1992b) que também podem modificar as frequências de micronúcleo nos animais aquáticos (PHAN et al. 2006). Até a presente data não foram encontrados trabalhos investigando detalhadamente tais variáveis para peixes antárticos.

Entre todos os índices hematológicos testados no presente trabalho – micronúcleo, núcleos reniforme, lobado e segmentado – o micronúcleo é o único destes índices que representa uma alteração já no seu órgão produtor.¹³

Mesmo que Weber e Montone (2006) tenham analisado todos os dados a partir de 1989 a 2002, e se tenham permitido concluir que o ambiente marinho próximo à Estação Brasileira pode ser considerado apenas levemente contaminado por hidrocarbonetos aromáticos de petróleo (PAHs), que são parte integrante do FSA, e onde foram coletados os animais para o presente estudo, não se pode descartar, segundo dados de o fato de que outros tipos de poluentes estejam dissolvidos na água.

Outro fator importante no desenho experimental do estudo foi o tempo de exposição ao poluente, ao se considerar as particularidades dos organismos antárticos quanto à fisiologia. Comparando dois trabalhos de regeneração por ferimento mecânico em peixes, Guerra (2008) encontrou regeneração em aproximadamente seis vezes menos tempo no bagre africano *Clarias gariepinus* do que Silva (2005) encontrou no mesmo experimento com o peixe antártico *Nothotenia coriiceps* (cabeçuda). A mesma discrepância de tempo se pode esperar, portanto, para um tipo de alteração mais sutil e demorada como por poluentes, não tão brusco como um ferimento mecânico.

¹³ **Hematopoiese:** Ao contrário do que se espera de um vertebrado, os eritrócitos dos peixes não parecem ser produzidos pela medula óssea, mas por uma estrutura denominada rim cefálico. No entanto, pouco se sabe sobre as origens da hematopoiese em teleósteos, e o rim cefálico é comumente tido como o órgão responsável por isso e, no entanto, o papel do baço não está totalmente claro (Siegl et al., 1993).

6 CONCLUSÃO

Com o presente trabalho, concluímos que não foi possível verificar se as RCs podem ou não ser utilizadas como um biomarcador histológico para poluição pela fração solúvel do petróleo (FSA), uma vez que nem mesmo outras medições a nível histológico puderam indicar se houve alteração frente ao grupo controle pelo poluente testado. Concluímos, por conta disso, que talvez um derramamento de petróleo em clima polar não dê efeitos perceptíveis (em até 15 dias) na biota marinha, principalmente pela quantidade de óleo que presumivelmente teria de ser derramado para que as proporções de 10% e 20% se tornem realidade em campo aberto.

REFERÊNCIAS¹⁴

- AL-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Genetic toxicology fish micronuclei for assessing genotoxicity in the water. **Mutation Research** v. 343, p 121-135, 1995.
- ANDERSON, J. W.; NEFF J. M.; COX B. A.; TATEM H. E.; HIGHTOWER G.M. Characteristics of Dispersions and Water-Soluble Extracts of Crude and Refined Oils Their Toxicity to Estuarine Crustaceans and Fish. **Marine Biology**, v. 27, p. 75-88, 1974
- AKAISHI, F. M. SILVA DE ASSIS, H. C., JAKOBI, S. C. G.; EIRAS-STOFELLA, D. R.; ST-JEAN, S. D., COURTENAY S. C., LIMA, E. F.; WAGENER, A. L. R.; SCOFIELD, A. L. OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax sp.*) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 244-253, 2004.
- AYLLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and *Poecilia latipinna*: an assessment of the fish micronucleus test. **Mutation Research**, n. 467, p 177-186, 2000.
- BAILLY, Y; DUNNEL-HERB, S; LAURENT, P. The neuroepithelial cells of the fish gill filaments indolamine – immunocytochemistry and innervation. **The Anatomical Record**, v. 233, p. 143-161, 1992.
- BARBER, D. L.; MILLS WESTERMANN, J. E.; JENSEN, D. N. New observations on the rodlet cell (*Rhabdospora thelohan*) in the white sucker *Catostomus commersoni* (Lacépède): LM and EM studies. **Journal of Fish Biology**, v. 14, p. 277 – 284, 1979.
- BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of the total environment**, v. 400, p. 212 – 226, 2008.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, p. 25-34, 1999.
- BORGES, J. C. S., BRANCO, P. C., PRESSINOTTI, L. N., SEVERINO, D., SILVA, J. R. M. C. Intranuclear crystalloids of Antarctic sea urchins as biomarker for oil contamination. **Polar Biology**, v. 33, p. 843-849, 2010.

¹⁴ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROMBERG, S.; NONATO, E. F.; CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V. Polychaetes distribution in the near-shore zone of Martel Inlet, Admiralty Bay (King George Island, Antarctica). **Bulletin of Marine Science**, v. 67 p. 175-188, 2000.

BRUNETTI, R.; FUMAGALLI, O.; VALERIO, P.; GABRIELE, M. *Genotoxic effects of anoxia on mytilus galloprovincialis*. **Marine Ecology**, v. 83, p. 71-74, 1992b.

CLARKE, A. Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. **Oceanography and Marine Biology: An annual review**, v. 21, p. 341-453, 1983.

CLARKE, A. What is cold adaptation and how should we measure it? **American Zoologist**, v. 31, p. 81-92, 1991.

CUNHA DA SILVA, J.R.M., BORGES, J.C.S.; JENSH-JUNIOR, B.E.; VELLUTINI, B.C.; PRESSINOTI, L.N. Microscopical study of experimental wound healing in *Nothotenia coriiceps* (Cabeçuda) at 0 °C . **Cell Tissue Research**, v. 321, p. 401-410, 2005.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plants effluents, **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 264-271, 2005a.

ÇAVAS, T.; ERGENE-GÖZÜKARA, S. Micronucleus test in fish cells: a bioassay for *in situ* of genotoxic pollution in the marine environment. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v. 46, p. 64-70, 2005b.

DAS, R. K.; NANDA, N. K. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of the fish, *Heteropneustes fossilis*, by mitomycin C and paper mill effluent. **Mutation Research**, v. 175, p. 67-71, 1986.

DE FLORA, S.; VIGANÒ, L.; D'AGOSTINI, F. D.; CAMOIRANO, A.; BENNASCO, M.; BENNICELLI, C.; MELODIA, F.; ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed *in situ* to polluted river water. **Mutation Research** v. 319, p. 167-177. 1993.

DEPLEDGE, M. H. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. **Environmental health perspectives**, v. 102, p. 101-104, 1994.

DE WITT, H .H.; HEEMSTRA, C.; GoN, O. Nototheniidae. In: GON, O. HEEMSTRA.C. eds. **Fishes of the Southern Ocean**. Grahamstown, South Africa: J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, 1990. p. 279-331.

DEZFULI, B. S.; CAPUANO, S.; MANERA, M. A description of rodlet cells from the alimentary canal of *Anguilla anguilla* and their relationship with parasitic helminths. **Journal of Fish Biology**. V 53, p. 1084-1095, 1998.

DEZFULI, B. S., SIMONI, E., ROSSI, R., MANERA, M. Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 43, p. 61-69, 2000.

DEZFULI, B. S.; GIARI, L.; KONECNY, R.; JAEGER, P.; MANERA, M. Immunohistochemistry, ultrastructure and pathology of gills of *Abramis brama* from lake Mondsee, Austria, infected with *Ergasilus sieboldi* (Copepoda). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 53, p. 257-262, 2003.

EASTAN, J. T., GRANDE, L. Evolution of the Antarctic fish fauna with emphasis on the recent notothenioids. In: CRAME, J. A. (ed.). **Origins and Evolution of the Antarctic biota**. Geological Society Special Publication, 1989. p. 241-252.

EASTMAN, J. T. **Antarctic fish biology**: evolution in a unique environment. London: Academic Press, 1993. 322p.

EASTMAN, J. T., DeVries, A.. Buoyancy Studies of Notothenioid Fishes in McMurdo Sound, Antarctica. **Copeia**, v. 2, p. 385-393, 1982.

ETKIN, D. S. **Financial costs of oil spills in the United States**. USA, Arlington, Massachusetts: Cutter Information Corporation, 1998, 346 p.

FENECH, M.; HOLLAND, N.; CHANG, W.P.; ZEIGER, E.; BONASSIS, S. The Human Micronucleus Project - An international collaborative study on the use of micronucleus technique for measuring DNA damages in humans. **Mutation Research**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FENECH M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F.; Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B.G. **Fish adaptation**. Science Publishers, Enfield, USA: Science Publishers, 2003. p. 285-308.

FISHELSON, L.; BECKER, K. Rodlet cells in the head and trunk kidney of the domestic carp (*Cyprinus carpio*): enigmatic gland cells or coccidian parasites? **Naturwissenschaften**, v. 86, p. 400-403, 1999.

FÖRLIN, L.; HAUX, C.; KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; LARSSON, A. Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, treated with cadmium. **Aquatic Toxicology**, v. 8, p. 51-64, 1986.

FRACÁCIO, R., VERANI, N. F., ESPÍNDOLA, E. L. G., ROCHA, O., RIGOLIN-SÁ., ANDRADE, C. A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 685-695, 2003.

FRENZILLI, G.; SCARCELLI, V.; DEL BARGA, I.; NIGRO, M.; FORLIN, L.; BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour, **Mutation Research**. 552, pp. 187–195, 2004.

GIRALDO, C.; CHEREL, Y.; VALLET, C.; MAYZAULD, P.; TAVERNIER, E.; MOTEKI, M.; HOSIE, G.; KOUBBI, P. Ontogenic changes in the feeding ecology of the early life stages of the Antarctic silverfish (*Pleurogramma antarcticum*) documented by stable isotopes and diet analysis in the Dumont d'Urville Sea (East Antarctica). **Polar Science**, v. 5, p. 252-263, 2011.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S.; ARAÚJO, J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 39-45, 2003.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. Juvenile sea bass liver P450, ERDO induction and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 51, p. 115-127, 2001.

GRAVATO, C.; SANTOS, M. A. β -Naphthoflavone liver ERDO and erythrocytic nuclear abnormality induction in juvenile *Dicentrarchus labrax* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 69-74, 2002.

GUERRA, R. R.; SANTOS, N. P.; CECARELLI, P.; SILVA, J. R. M. C.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. *Healing of skin wounds in the African catfish Clarias gariepinus*. **Journal of Fish Biology**, v. 73, p. 572-583, 2008.

HAYAT, M. T. **Fixation for electron microscopy**. London: Academic Press, 1981. 375 p.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press. 1987.

HELLAWELL, J. M. Toxicant substances in river and streams. **Environmental Pollution**, v. 50, p. 61-85, 1988.

HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MACKINNON, M.; DIXON, D. G. Disease and gill lesions in Yellow Perch (*Perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, p. 334-341. 2000.

HINTON, D. E., BAUMANN P. C., GARDNER, G. R., HAWKINS, W. E., HENDRICKS, J. D., MURCHELANO, R. A. and OKIHIRO, M. S., 1992. Histological biomarkers. In: HUGGETT, R. A., KIMERLE, MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L., **Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton, FL: Lewis publishers, 1992. p. 155-209. 1992.

IGER, Y.; ABRAHAM, M. Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors, **Tissue and cell**, v. 29, p. 431-438, 1997.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 680-693, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U. Histology revisited – technical improvement promoted by the use of hydrophilic resin embedding. **Ciência e Cultura**, v. 47, p. 92-95, 1995.

KARAN, V.; VITOROVIC, S.; TUTUNDZIC, V.; POLEKSIC, V. Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 49-55, 1998.

KATAOKA, A. P. A. G. **Biodegradação de resíduos oleosos de refinaria de petróleo por microrganismos isolados de “landfarming”**. 2001. 202f. Tese (Doutorado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista de Rio Claro, 2001

KRAMER, C. R.; POTTER, H. Ultrastructural observations on rodlet cell development in the head kidney of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 80, p. 1422-1436, 2002.

KRAMER, C. R.; POTTER, H. Rodlet cells in the posterior intestine of embryos and neonates of two poeciliid species **Journal of fish Biology**, v. 62, p. 1211-1216, 2003.

KRAMER, C. R.; KRAMER, A. J.; KONOVALOV, A. Rodlet cell distribution in the gall bladder epithelium of *Fundulus heteroclitus*. **Journal of Fish Biology** v. 67, p. 555-560, 2005.

LAURENT, P; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiological Zoology**, v. 64, p. 4-25, 1990.

LEINO, R. L. Rodlet cells in the gill and intestine of *Catostomus commersoni* and *Perca flavescens*: a comparison of their light and electron microscopic cytochemistry with that of mucous and granular cells **Canadian Journal of Zoology**, v. 60, p. 2768-2782, 1982.

LI, S.; XIAO, X.; YIN, X.; WANG F. Bacterial community along a historic lake sediment core of Ardley Island, west Antarctica. **Extremophiles**, v. 10, p. 461-467, 2006.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 57, p. 195-211, 1993.

LIVINGSTONE, D. R. the fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 120, p. 43-49, 1998.

LOPES, F. **Royalties e Eqüidade no Brasil**. Trabalho final da cadeira Meio Ambiente, Energia e Eqüidade, Rio de Janeiro, RJ, Brasil: COPPE/UFRJ, 2005.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science**, v. 42, p. 630, 1985.

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. **Environmental International**, v. 29, p. 923-929, 2003.

MANERA, M.; DEZFULI, B. S. Rodlet cells intelegosts: a new insight into their nature and functions. **Journal of Fish Biology**, v. 65, p. 597-619, 2004.

MARTIN J. R, L. K.; BLACK, M. C. Biomaker assessment of the effects of petroleum refinery contamination on channel catfish. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 33, p. 81-87, 1996.

MATTEY, D. L.; MORGAN, M.; WRIGHT, D. E.; Distribution and development of rodlet cells in the gills and pseudobranch of the bass *Dicentrarchus labrax* (L.). **Journal of Fish Biology**, v. 15, p. 363-370, 1979.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section A**, v. 88, p. 52-63, 2002.

MAZON A. F.; HUISING M. O.; TAVERNE-THIELE A. J.; BASTIAANS J.; VERBURG-VAN KEMENADE B.; M.; L. The first appearance of rodlet cells in carp (*Cyprinus carpio* L.) ontogeny and their possible roles during stress and parasite infection. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 22, p. 27-37, 2007.

MCDOWELL, E. M., TRUMP, B. F. Histologic fixatives suitable for diagnostic light and electron microscopy. **Archives of Pathology; Laboratory Medicine**, volume 100, p. 405-14, 1976.

MENDONÇA, I.; MATOS, E.; RODRIGUES, G.; MATOS, P.; CASAL, G.; AZEVEDO, C. Rodlet cells from the gills and kidneys of two Brazilian freshwater fishes: an ultrastructural study. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 22, p. 187-192, 2005.

MERSH, J.; BEUVAIS, M. N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in Haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research**, v. 371, p. 47-55, 1996.

METCALFE, C. D. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*).

losos), **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 489-495, 1988.

MEYER, J. S., H. M.; LEASE; H. L. BERGMAN. 2000. **Chronic toxicity of low dissolved oxygen concentrations, elevated pH, and elevated ammonia concentrations to lost river suckers (*Deltistes luxatus*) and swimming performance of lost river suckers at various temperatures**. Laramie, University of Wyoming Research Report, 2000. 56 p.

NICODEM, D. E.; GUEDES, C. L. B.; FERNANDES, M. C. Z.; SEVERINO, D. ; CORREA, R. J.; COUTINHO, M. C.; SILVA, J. Photochemistry of petroleum. **Progress in Reaction Kinetics and Mechanism**, v. 26, p. 219-238, 2001.

OPALINSKI, K. W. Metabolic cold adaptation in Antarctic amphipods. **Polish Journal of Ecology**, v. 27, p. 323-331, 1979.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of EROD Activity and Genotoxic Effects by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Resin Acids on the Juvenile Eel (*Anguilla Anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 38, p. 252-259, 1997.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, p. 71-76, 1998.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, endocrine and genetic responses of *Anguilla Anguilla* L.) to petroleum distillate product and environmentally contaminated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 64-75, 2001.

PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Naphtalene and β -naphthoflavone effects on *Anguilla anguilla* L. hepatic metabolism and erythrocytic nuclear abnormalities. **Environment International**, v. 28, p. 285-293, 2002.

PARTEARROYO, M. A., PILLING, S. J., JONES, M. N. The effects of surfactants on the permeability of isolated perfused fish gills to urea. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 101, p. 653-659, 1992.

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. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Station "Comandante Ferraz", King George Island. **Polar Biology**, v. 30, p. 209-217, 2006.

PHILLIPS, D. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments – a review. **Environmental Pollution**, v. 13, p. 281-317, 1977.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; R. LLOYD. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. United Nation, Fishing News Books. 1994, p. 339-352.

RANDAL, D.; WRIGT, P. A. Gill water flow and the chemistry of the boundary layer. **Physiological Zoology**, v. 64, p. 26-38, 1990.

REITE, O. B. The rodlet cells of teleostean fish: their potential role in host defence in relation to the role of mast cells/eosinophilic granule cells. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 19, p. 253-267, 2005.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electronic-opaque stain in electron microscopy. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 17, p. 208-213, 1963.

ROBERTS, R. J. The anatomy and physiology of teleosts. In: ROBERTS, R. J.: **Fish pathology**. London: Bailliere Tindall, 1978, p. 13–103

ROCHA-CAMPOS, A. C. e SANTOS, P. R. **Ação geológica do gelo**. In **Decifrando a Terra**. 2000. Oficina de Textos, 568 p.

RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K.; JÚNIOR, E.R.; OLIVEIRA, M. F.; CARVALHO, C.S.; VANI, G. S. Antarctic fish metabolic responses as potential biomarkers of environmental impact. **Oecologia Australis** v.15, 124-149

RÖMISCH, K.; MATHESON, T. Cell biology in the Antarctic: studying life in the freezer. **Nature Cell Biology**, v. 5, p. 3-6. 2003.

SASTRY, A. N.; MILLER, D. C, Application of biochemical and physiological responses to water quality monitoring. In: F. J. VERNBERG, A.; CALABRESE, F.P.; THURBERG, VERNBERG, W. B. **Biological monitoring of marine pollutants**, New York: Academic Press. 1981. p. 265-294.

SAYER, M. D. J. DAVENPORT, J. The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and one freshwater teleost species. **Journal of Fish Biology**, v. 31, p. 561-570, 1987.

SIDERITS, D.; BIELEK, E. Rodlet cells in the thymus of the zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). **Fish Shellfish Immunology** v. 27, p. 539-548. 2009.

SIEGL, E.; ALBRECHT, S.; LÜDTKE, B., Long-term liquid culture of hematopoietic precursor cells from the head kidney and spleen of the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). **Comparative Haematology International** v. 3, p.168-173, 1993.

SILVA, J. R. M. C.; MENDES, E. G.; MARIANO, M. Wound Repair And Graft Rejection In The Amphioxus (*Branchiostoma platy*). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 65, p. 147-151, 1995.

SILVA, J. R. C. M.; COOPER, E. L.; SANTOTORINI, I. L.; BORGES, J. C. S.; JENSCH-JUNIOR, B. E.; PORTO-NETO, L. R.; HERNANDEZ-BLASQUEZ, F. J.; VELLUTINI, B. C.; PRESSINOTTI, L. N.; COSTA-PINTO, F. A.. Microscopical study of experimental wound healing in *Notothenia coriiceps* (Cabeçuda) at 0 °C. **Cell and Tissue Research**, v. 321, p. 401-410, 2005.

SCHMACHTENBERG O., Epithelial sentinels or protozoan parasites? Studies on isolated rodlet cells on the 100th anniversary of an enigma. **Revista Chilena de Historia Natural**, 80, p. 55-62, 2007.

SCHOLANDER, P. F.; FLAGG, W.; WALTERS, W.; IRVING, L. Climatic adaptations in arctic and tropical poikilotherms. **Physiological Zoology**, v. 26, p. 67-69, 1953.

SCHUCH, L. A. **Operação antártica X: uma experiência vivenciada**. In: Universidade federal de Santa Maria e instituto nacional de pesquisas espaciais. 3ª ed, Santa Maria, UFSM. 1994. 178p.

SCHWAIGER, J., WANKE, R., ADAM, S., PAWERT, M., HONNEN, W., TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Ecosystem Stress and Recovery** v. 6, p. 75–86. 1997.

TABAN, I. C.; BECHMANN, R. K.; TORGRIMSEN, S.; BAUSSANT, T.; SANNI, S. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to oil using comet assay. **Marine Environmental Research**, v. 58, p.701-705, 2004.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P., SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcariferi*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.

VIANNA, A. C. C.; FANTA, E.; HAAPALAINEN, E. Comparative morpho-functional study of the intestine of Antarctic fish *Notothenia cooriceps* and *Trematomus newnesi* (Nototheniidae): Histology and ultrastructure. **Nankyoku Shiriô (Antarctic Record)**, v. 44, p. 61-82, 2000.

VIVAI, A. B. B. S. **Efeitos da fração solúvel de petróleo (FSA) no peixe antártico *Trematomus newnesi* (Boulenger, 1902)**. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2011.

WEBER, R. R.; MONTONE, R. C. **Rede 2: gerenciamento ambiental na Baía do Almirantado, Ilha do Rei George**. Relatório técnico. Local: CNPq/PROANTAR, 2006. 261p.

WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VETHAAK, A. D.; GRINWIS, G. C. M.; VOS, J. G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 11, p. 289-295, 2002.

WHOLSCHALG, D. E. Respiratory metabolism and ecological characteristics of some fishes in McMurdo Sound, Antarctica. In: LEE, M. O. **Biology of the Antarctic seas**. Washington DC: Geophysical Union, 1964. p. 33-62.