

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

TESE

**Uso de Peixes como Bioindicadores de Impactos Ambientais
nas Baías de Paraty e Sepetiba, RJ: Biomarcadores Histológicos**

Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL**

**USO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES
DE IMPACTOS AMBIENTAIS NAS BAÍAS
DE PARATY E SEPETIBA, RJ:
BIOMARCADORES HISTOLÓGICOS**

THATIANA LUIZA ASSIS DE BRITO CARVALHO

Sob a orientação da Professora

Dra. Aparecida Alves do Nascimento

Co-orientação do Professor

Dr. Armando Sales

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora em
Ciências**, no Programa de Pós-Graduação
em Biologia Animal.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AA848u Assis de Brito Carvalho, Thatiana Luiza, 1988-
Uso de peixes como bioindicadores dos impactos ambientais nas baías de Paraty e Sepetiba RJ: Biomarcadores histológicos / Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho. - Seropédica, 2022.
113 f.: il.

Orientadora: Aparecida Alves do Nascimento.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, 2022.

1. bioindicador. 2. histologia. 3. brânquia. 4. rim. 5. hepatopâncreas. I. Alves do Nascimento, Aparecida, 1975-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal III. Título.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. "This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.”



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL



TERMO Nº 1340 / 2022 - PPGBA (12.28.01.00.00.00.42)

Nº do Protocolo: 23083.078117/2022-45

Seropédica-RJ, 28 de dezembro de 2022.

Seropédica, 23 de dezembro de 2022.

THATIANA LUIZA ASSIS DE BRITO CARVALHO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor(a)** no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Área de Concentração em Biodiversidade Animal.

TESE APROVADA EM 23/12/2022

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do STPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

APARECIDA ALVES DO NASCIMENTO (orientadora)

CLARICE MACHADO DOS SANTOS (UFF)

BERNADETE MARIA DE SOUSA (UFIF)

ANA LUIZA BASTOS (UFF)

LEILANE MARIA BARCELLOS NEPOMUCENO

MARCOS ANTONIO JOSE DOS SANTOS

VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA CARVALHO

(Assinado digitalmente em 28/12/2022 12:37)
APARECIDA ALVES DO NASCIMENTO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: 3379802

(Assinado digitalmente em 28/12/2022 11:06)
LEILANE MARIA BARCELLOS NEPOMUCENO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: 2142629

(Assinado digitalmente em 29/12/2022 08:36)
MARCOS ANTONIO JOSE DOS SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptBA (12.28.01.00.00.00.45)
Matricula: 387081

(Assinado digitalmente em 29/12/2022 07:56)
VIVIAN DE ASSUNCAO NOGUEIRA CARVALHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DFSP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: 2606155

(Assinado digitalmente em 29/12/2022 10:55)

(Assinado digitalmente em 29/12/2022 12:37)

CLARICE MACHADO DOS SANTOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 086.140.217-04

BERNADETE MARIA DE SOUSA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 383.114.616-08

(Assinado digitalmente em 30/12/2022 16:05)
ANA LUIZA BASTOS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 023.518.377-62

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **1340**, ano: **2022**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **28/12/2022** e o
código de verificação: **9ac3835779**

Dedico esta tese a minha mãe, e a todos que contribuíram direta ou indiretamente na sua confecção.

AGRADECIMENTOS

Esta tese foi desenvolvida na Área de Histologia e Embriologia, Departamento de Biologia Animal, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. A parte experimental do trabalho foi realizada com o apoio do Laboratório de Ecologia de Peixes (LEP - UFRRJ), e contou com o apoio do Instituto Oswaldo Cruz / Laboratório de Transmissores de Leishmanioses, juntamente com a pesquisadora da Fiocruz Dra. Jacenir Mallet. A estas instituições agradeço os meios colocados a minha disposição para a elaboração da tese.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro.

À professora Dra. Aparecida Alves do Nascimento por todos os ensinamentos, excelentíssimo trabalho, sempre prestativa e atenciosa aos detalhes, meu agradecimento pelo convívio e crescimento pessoal. Ao professor Dr. Armando Sales, por todo auxílio com as colorações, microtomia e processamento histológico. Como orientadores científicos, manifesto minha gratidão por todo apoio, paciência, orientação, ensinamentos prestados, rigor científico e acima de tudo a amizade.

Meus agradecimentos ao Professor Dr. Francisco Gerson Araújo pelo excelentíssimo trabalho e todo apoio dado na execução deste Projeto e aos colegas do Laboratório de Ecologia de Peixes que colaboraram de forma incomensurável na coleta de todo o material aqui estudado, em especial ao Tailan Moreti, Natalice Santos e Ruth Callegario.

Aos professores e funcionários da Área de Histologia e Embriologia, dirijo um especial agradecimento pela boa convivência e pelos ensinamentos compartilhados, em especial a Ilza Lucas Coelho Meirelles por todo o auxílio durante a rotina laboratorial, por sua amizade e incentivo em todos os momentos. A Enely e Nathália por incentivarem meu pontapé inicial nesta jornada, e ao Caio Gonçalves e estagiária Thiane por toda ajuda na confecção deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições e disponibilidade.

À Deus e a Nossa Senhora Aparecida por me abençoarem durante esta jornada.

À minha família, e amigos, pela motivação e apoio que me proporcionaram.

“De quantas decepções o ser humano ainda precisa
para aprender que tudo é no tempo de Deus!?”

(Autor Desconhecido)

RESUMO

ASSIS DE BRITO, Thatiana Luiza. **Uso de peixes como bioindicadores dos impactos ambientais nas baías de Paraty e Sepetiba RJ: Biomarcadores histológicos.** 2022. 113p. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

A baía de Sepetiba vem sofrendo fortemente por atividades antrópicas, enquanto a baía de Paraty mesmo com a presença de fontes de contaminação parece não sofrer grandes efeitos ambientais. O uso de bioindicadores é considerado uma importante ferramenta para monitoramento ambiental em ecossistemas aquáticos, no qual a utilização de peixes é eficiente. A histologia é um importante biomarcador, podendo ser utilizada como um eficaz instrumento para analisar os efeitos dos poluentes, além de outros estressores sobre os peixes. As brânquias, hepatopâncreas e rins são órgãos alvo para a ação dos poluentes existentes no ambiente aquático podendo se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo alterações estruturais. Nesse sentido foram analisadas alterações histológicas nos órgãos citados, a fim de avaliar o uso dos peixes *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) como bioindicadores da qualidade ambiental das Baías de Paraty e Sepetiba, localizadas no estado do Rio de Janeiro. Para a realização do presente estudo foram utilizados um total de 75 peixes coletados das Baías de Paraty e Sepetiba e foram realizadas técnicas histológicas e histoquímicas nos mesmos, a fim de avaliar o impacto ambiental na histologia dos órgãos analisados. As coletas foram realizadas no período compreendido entre 03/03/2015 e 02/04/2016. Nas espécies coletadas na Baía de Paraty as lesões comumente encontradas foram infiltração leucocitária, vasodilatação e congestão lamelar nas brânquias; hipertrofia celular, dilatação do lúmen tubular e regeneração tubular nos rins; hipertrofia nuclear, núcleos irregulares, lateralização nuclear no hepatopâncreas. Enquanto nos peixes da Baía de Sepetiba as alterações de estágio III (alterações graves), que são as mais relevantes, pois são irreversíveis foram encontradas em maior quantidade. Além disso, as brânquias foram consideradas o órgão mais indicado para análise de impactos ambientais, tendo em vista que as percentagens das lesões analisadas indicam que o tecido branquial sofreu maior ocorrência de alterações histológicas de estágio III na Baía de Sepetiba. Por conseguinte, as percentagens das alterações de mesmo estágio encontradas nos hepatopâncreas e rins, mostram-se inferiores quando comparadas as das brânquias. Desta forma, biomarcadores histológicos podem ser utilizados como uma ferramenta de baixo custo como bioindicador de impactos ambientais por meio da determinação da saúde do *Menticirrhus americanus* e *Micropogonias furnieri* pertencentes a família dos cienídeos.

Palavras-chave: brânquias, hepatopâncreas, rim, histologia, bioindicador, cienídeos.

ABSTRACT

ASSIS DE BRITO, T. L. **Use of fish as bioindicators of environmental impacts in the Bays of Paraty and Sepetiba, RJ: Histological biomarkers.** 2022. 113p. Thesis (Ph.D. in Animal Biology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2022.

Sepetiba Bay has been suffering heavily from anthropogenic activities, while Paraty Bay even with the presence of contamination sources does not seem to suffer major environmental effects. The use of bioindicators is considered an important tool for environmental monitoring in aquatic ecosystems, in which the use of fish is efficient. Histology is considered an important biomarker and can be used as an effective instrument to analyze the effects of pollutants and other stressors on fish. The gills, hepatopancreas and kidneys are target organs for the action of pollutants in the aquatic environment and can manifest at various levels of biological organization, including structural changes. In this sense, histological changes were analyzed in the gills, kidneys and hepatopancreas, in order to evaluate the use of the fish *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) and *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) as bioindicators of the environmental quality of the Bays of Paraty and Sepetiba, located in the state of Rio de Janeiro. For the accomplishment of the present study a total of 75 fishes were collected from the Bays of Paraty and Sepetiba and used histological and histochemical techniques in order to evaluate the environmental impact on the histology of organs analyzed. The collections were carried out in the period between 03/03/2015 and 02/04/2016. In the species collected in the Bay of Paraty the lesions commonly found were leukocyte infiltration, vasodilation and lamellar blood congestion in gills; cellular hypertrophy, dilation of the tubular lumen, and tubular regeneration in kidney; nuclear hypertrophy, irregular shaped nucleus, nuclear lateralization in hepatopancreas. Stage III changes are the most important because they are irreversible. In addition, the gills were considered the most appropriate organ for analysis of environmental impacts, considering that the percentages of the lesions analyzed indicate that the gill tissue suffered the highest occurrence of histological alterations stage III (severe alterations) in Sepetiba Bay. Therefore, the percentages of the same stage changes found in the hepatopancreas and kidneys, are inferior when compared to those of the gills. Thus, histological biomarkers can be used as a low cost tool as a bioindicator of the environmental impacts by determining the health of *Menticirrhus americanus* and *Micropogonias furnieri*, from the family of the cyanides.

Keywords: gills, hepatopancreas, kidney, histology, bioindicator, cyanides.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AB – Alcian Blue

CM – Células Mucosas

CMB – Componentes da Membrana Basal

CMM – Centros Melanomacrofágicos

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DP – Desvio Padrão

Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz

HE – Hematoxilina-Eosina

IAH – Índice de Alterações Histológicas

M. F. – *Micropogonias furnieri*

M.A. – *Menticirrhus americanus*

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

OD – Oxigênio Dissolvido

PAS – Ácido Periódico de Schiff

PCB – Bifenos Policlorados

UFRRJ – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

UNT – Unidade Nefelométrica de Turbidez

VMA – Valor Médio de Alterações

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar utilizado de <i>M. americanus</i> . Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018)	4
Figura 2. Exemplar utilizados de <i>M. furnieri</i> . Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018)	5
Figura 3. Áreas de estudo. Baía de Paraty e baía de Sepetiba. Fonte: Própria (2018)	7
Figura 4. Ilustração da anatomia interna em peixe teleósteo. Fonte: https://www.freepik.es/vector-premium/ilustracion-de-vector-de-peces-de-anatomia.htm (2018)	10
Figura 5. (A) Macrofotografia da brânquia em teleósteo; (B) Fotografia indicando a localização do opérculo em teleósteo. Fotos elaboradas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018)	11
Figura 6. (A) Parte anterior do arco branquial “a” revestida pelo rastro branquial “B”, e a parte posterior com uma das duas fileiras de filamentos; (B) Lamelas “L” distribuídas ao longo do filamento “F” (adaptado de WEGNER, 2012)	12
Figura 7. Fotomicrografias de brânquias. (A) Arco e rastro branquial compostos por uma lamela óssea ou cartilaginosa, tendo como base o epitélio estratificado pavimentoso composto por diversos tipos celulares; (B) Lamelas branquiais constituídas por um epitélio simples pavimentoso, composto por diversos tipos celulares. Coloração: HE. Aumentos: 150x e 1150x	13
Figura 8. Diagrama demonstrando as estruturas da lamela primária e secundária das brânquias. Fonte: Própria autoria (2018)	15
Figura 9. (A) Fotografia indicando a localização retroperitoneal do rim em peixe teleósteo; (B) Macrofotografia do rim. Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018)	16
Figura 10. Ilustrações representando os 5 tipos de rim. Fonte: OGAWA, 1961	17
Figura 11. Néfrons típicos de teleósteos. Fonte: REIMSCHUESSEL, 2001	20
Figura 12. Macrofotografia do hepatopâncreas. (A) Indicação da localização do hepatopâncreas rim em teleósteo (<i>M. americanus</i>). (B) Macrofotografia do hepatopâncreas (<i>M. americanus</i>). Fonte: Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ	21
Figura 13. Padrão histomorfológico. (A) <i>M. furnieri</i> ; (B) <i>M. americanus</i> . Coloração: HE. Aumento: 150x	37
Figura 14. Lamela primária e lamela secundária, compostas por diversos tipos celulares: células epiteliais (▲), célula pilar (*), eritrócitos (→), célula clorídrica (▽). Coloração: HE.....	38
Figura 15. Fotomicrografia do arco branquial de <i>M. furnieri</i> . Fibras musculares em vermelho róseo e colágeno em azul. Coloração: Tricrômico de Gomory. Aumento: 300x	39
Figura 16. Microscopia Eletrônica de Transmissão da brânquia de <i>M. furnieri</i> . (A) Célula pavimentosa - pv; fibrócito - f; (B) Cripta apical - ca da célula clorídrica; célula clorídrica - cc; célula pavimentosa - PV; (C) Eritrócito - e; célula Mucosa – CM; (D) Lâmina Basal – lb; eritrócito – e; célula pavimentosa - pv	41
Figura 17. Presença de áreas de desprendimento epitelial (↗) de modo irregular e formação de edema (▼). Algumas células se desprendem em sua porção apical e outras em sua porção basal.	

Coloração: HE	42
Figura 18. Aglomerado de células inflamatórias (▼) e hemácias (↖). Coloração: HE. Aumento: 1150x	43
Figura 19. Proliferação do epitélio de revestimento (▼), o qual encontra-se, intensamente, eosinofílico e presença de um aglomerado de células sanguíneas na porção interna da lamela (▽). Coloração: HE. Aumento: 1150x	44
Figura 20. Perda focal da organização da arquitetura da lamela secundária (▼). Coloração: HE. Aumento 1150x	45
Figura 21. Presença de dilatações lamelares associada a aglomeração de hemácias frente a um extravasamento destas no interior das lamelas (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x	46
Figura 22. Células com citoplasma eosinofílico, homogêneo e núcleos necróticos (picnose “↑” e cariorexia “↗”). Coloração: HE. Aumento 1150x	47
Figura 23. Fotomicrografias de brânquias das espécies estudadas, indicando a descrição das alterações histológicas. (A) Presença de áreas com deslocamento epitelial; vacuolização do edema intersticial (→) ; estrutura ovalada de coloração eosinofílica apresentando bordas delimitadas – parasito; proliferação do epitélio de revestimento – hiperplasia do epitélio lamelar (↔) e vasodilatação 300x. (B) Presença de células inflamatórias - infiltração leucocitária (↘); deslocamento epitelial; e perda de organização da arquitetura da lamela - fusão lamelar 300x. (C) congestão lamelar e cartilagem elástica 630x. (D) Dilatação lamelar é observada - aneurisma e elevação epitelial (→) 1150x. (E) Elevação epitelial (→) e infiltração de leucócitos (↘) 630x. (F) Presença de citoplasma eosinófilo e necrose - necrose (☞) e vasodilatação. Coloração: HE 1310x.....	49
Figura 24. Histologia e histoquímica de brânquias: (A) Destaque de células mucosas. Coloração em HE. Aumento: 1150x. (B) Células coradas em magenta nas lamelas secundárias (reação positiva ao PAS) indicando a presença de glicoconjugados neutros. Aumento: 1150x. (C) Células de lamelas secundárias com reação positiva ao AB, indicando a presença de glicoconjugados. Aumento: 300x. (D) Distribuição uniforme das células mucosas ácidas na lamela branquial. Aumento: 150x.....	51
Figura 25. Efeitos do aumento da quantidade de secreção de mucos ácidos e neutros. (A) Contagem das células positivas para secreção de mucos ácidos demonstrou aumento nos animais coletados na baía de Sepetiba quando comparados com a baía de Paraty em ambas as espécies. (B) A quantidade de células positivas para secreção de mucos neutros foi maior na baía de Sepetiba na espécie <i>M. americanus</i> , enquanto na espécie <i>M. furnieri</i> indicou um aumento na baía de Sepetiba, porém sem diferença estatística. Dados (n = 10 por grupo) são expressos como média ± DP. *P < 0.05 vs. grupo baía de Paraty x baía de Sepetiba	52
Figura 26. Cortes histológicos de brânquias de peixes infectados por parasitas. (A) Parasita na camada muscular da brânquia. (B) Parasita na lamela branquial. Coloração: HE. Aumentos: 1150x e 300x.....	53
Figura 27. Presença de túbulos renais, tecido hematopoiético e centros melanocrofágicos. Coloração: HE	62
Figura 28. Células dos túbulos proximais do rim, revelando a presença de abundante glicocálice associado aos microvilos (borda em escova) em sua região apical (*). Coloração: PAS. Aumento:1150x.....	63
Figura 29. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma seção tangencial de um capilar glomerular. (A) Célula mesangial (▼) com um prolongamento citoplasmático	

incorporada nos componentes da membrana basal (CMB). Processo celular mesangial (M). Células colunares (↙). (B) Componentes da membrana basal (CMB). Processos celulares mesangiais (M). Fibras colágenas (△)	64
Figura 30. Alteração histológica no corpúsculo renal, o triângulo (▼) mostra o processo de hipertrofia glomerular, já a seta (↵) indica o relaxamento do músculo liso indicando o processo de dilatação capilar do glomérulo. Coloração: HE. Aumento: 1150x	65
Figura 31. Células com alteração no tamanho asterisco (*) indicam a hipertrofia nuclear, já a seta (↖) aponta a hipertrofia celular. Coloração: HE. Aumento: 1150x	66
Figura 32. Células com ausência de coloração são indicadas por triângulos (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x	67
Figura 33. Células dos túbulos proximais do rim, revelando a presença de abundante glicocálice associado aos microvilos (“borda em escova”) em sua região apical (*). Coloração: PAS. Aumento: 1150x.....	68
Figura 34. Reunião de estruturas esféricas basofílicas entremeadas ao parênquima, assim como a presenças de pigmento acastanhado granular (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x	69
Figura 35. Túbulos compostos por células cúbicas, no qual o contorno celular não se encontra bem definido (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	70
Figura 36. Parênquima renal apresentando basofilia tubular, aglomerado de núcleos e aumento de mitoses indicando a tentativa de regeneração tubular (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	71
Figura 37. Na cápsula de Bowman observamos excesso de hemácias na rede de capilares (↵), além do aumento do espaço da cápsula (▼), e glomérulos dilatados (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	72
Figura 38. Parênquima renal com presença de túbulos compostos por células cúbicas de citoplasma tumefeito, claro, e núcleo de aspecto necrótico, ou ausência de núcleo (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x	73
Figura 39. Fotomicrografias de rim das espécies estudadas, indicando alterações histológicas nos rins. (A) Componentes estruturais: tecido hematopoiético (TH), túbulo renal (Tb) e cápsula de Bowman (cB). Alteração histológica: vasodilatação (*); (B). Congestão sanguínea na cápsula de Bowman (seta), dilatação do lúmen do túbulo (asterisco); (C) Oclusão do lúmen tubular (seta), hipertrofia celular (cabeça de seta); (D) Degeneração tubular (★), centro melanomacrofágico (cabeça de seta), hipertrofia glomerular (*). Coloração: HE	75
Figura 40. Fotomicrografia do hepatopâncreas da <i>M. furnieri</i> . Hepatopâncreas formado por aglomerados de ácinos pancreáticos (P) distribuídos ao redor do fígado (L). Coloração: HE	83
Figura 41. Fotomicrografias de hepatopâncreas. (A) Demonstração do órgão formado por aglomerados de ácinos pancreáticos (P) distribuídos em torno dos ramos da veia porta (↙) do fígado (L). (B) Tecido pancreático exócrino (*) separado do parênquima hepático (▷) por uma fina camada de cápsula do tecido conjuntivo (▼). Coloração: TG.....	84
Figura 42. Representação da marcação de hemossiderina no hepatopâncreas de teleósteos (*). Coloração: PERLS. Aumentos: 150 x e 800x	85
Figura 43. (A) Marcação de fibras reticulares no hepatócito (↵); (B) Grânulos de hemossiderina destacados em vasos (▼). Aumento: 1150x. Coloração: PERLS.....	86

Figura 44. Presença de hepatócitos com alteração no tamanho do núcleo (↵) e da célula (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	87
Figura 45. Parênquima hepático com a presença de núcleos comprimidos lateralmente e irregulares (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	88
Figura 46. Hepatopâncreas apresentando áreas com alterações no citoplasma, vacuolização citoplasmática (▼) e no núcleo (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	89
Figura 47. Grânulos eosinofílicos difusos no citoplasma (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	90
Figura 48. Porção do hepatopâncreas indicando congestão sanguínea (↵), além de características focais de cor marrom-pálida centro de melanomacrófagos (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	91
Figura 49. Alteração resultante de doença biliar ou obstrução dos ductos biliares no hepatopâncreas (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	92
Figura 50. Parênquima hepático com presença hepatócitos de citoplasma tumefeito, claro, e núcleo de aspecto necrótico, ou ausência de núcleo (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.....	93
Figura 51. Fotomicrografias do hepatopâncreas de <i>M. americanus</i> e <i>M. furnieri</i> , indicando alterações histológicas. (A) Agregado melanomacrofágico (cabeça de seta); (B) Ducto biliar (asterisco), veia (cabeça de seta), congestão sanguínea (estrela), degeneração (seta); (C) Sinusoides (asterisco), hepatócitos (seta), estagnação biliar (cabeça de seta), hipertrofia nuclear (asterisco), lateralização nuclear (estrela); (D) Parasito. Coloração: HE.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados sobre a coleta dos peixes.....	27
Tabela 2. Média e desvio padrão dos dados analisados da água dos locais de coleta.....	32
Tabela 3. Frequência da ocorrência de alterações histológicas encontradas nas brânquias de <i>M. americanus</i> e <i>M. furnieri</i> nas baías de Paraty e Sepetiba.....	50
Tabela 4. Frequência da ocorrência de alterações histológicas encontradas nos rins de <i>M. americanus</i> e <i>M. furnieri</i> nas baías de Paraty e Sepetiba.....	76
Tabela 5. Frequência da ocorrência de alterações histológicas encontradas no hepatopâncreas de <i>M. americanus</i> e <i>M. furnieri</i> nas baías de Paraty e Sepetiba.....	96

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Espécies Seleccionadas.....	3
2.2 Áreas de Estudo.....	5
2.3 Biomarcadores e Bioindicadores Histológicos.....	7
2.4 Órgãos Alvo.....	10
2.4.1 Brânquia.....	10
2.4.2 Rim.....	16
2.4.3 Hepatopâncreas.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo Geral.....	24
3.2 Objetivos Específicos.....	24
4. HIPÓTESE.....	25
5. JUSTIFICATIVAS.....	26
6. METODOLOGIA.....	27
7. ANÁLISE DA ÁGUA (RESULTADOS / DISCUSSÃO).....	31
8. CAPÍTULO I	33
8.1 Objetivos Específicos.....	36
8.2 Resultados.....	37
8.3 Parasitas.....	53
8.4 Discussão.....	54
8.5 Conclusão.....	57
9. CAPÍTULO II –	58
9.1 Objetivos Específicos.....	61
9.2 Resultados.....	62
9.3 Discussão.....	76
9.4 Conclusão.....	78
10. CAPÍTULO III -	79
10.1 Objetivos Específicos.....	82
10.2 Resultados.....	83
10.3 Discussão.....	96
10.4 Conclusão.....	98
11. REFERÊNCIAS.....	99
12. ARTIGOS PUBLICADOS.....	113

1 INTRODUÇÃO GERAL

As regiões litorâneas nas quais se encontram enseadas, baías, lagunas costeiras e estuários, a atividade humana é uma das principais responsáveis pela poluição dos ecossistemas aquáticos devido ao aumento dos efluentes agrícolas, industriais e domésticos, que constantemente apresentam uma grande variedade de poluentes orgânicos e inorgânicos. Os ambientes aquáticos localizados próximos a unidades industriais estão sob alto risco de serem contaminados por poluentes, tais como produtos químicos de petróleo, solventes, óleos e metais pesados (RAJAMANICKAM; NARAYANAN, 2009). Estas regiões litorâneas são reconhecidas como áreas de alimentação e reprodução para um número considerável de espécies de peixes, atuando como habitat temporário durante fases do ciclo de vida ou ainda como habitat permanente para outras espécies (DAY; HALL; KEMP; YÁÑEZ-ARANCIBIA, 1990).

A baía de Sepetiba, é um dos mais importantes ecossistemas aquáticos do estado do Rio de Janeiro, abriga um grande número de peixes em seus primeiros anos de vida e espécies de pequeno porte que ocorrem na zona de arrebentação (ARAÚJO; CRUZ-FILHO; AZEVÊDO; SANTOS, 1998). Suas características ambientais exercem forte atratividade para o desenvolvimento de inúmeras atividades humanas com forte magnitude de impactos ambientais como a atividade portuária. A biota aquática, e em particular a comunidade de peixes como organismos associados diretamente às condições ambientais, podem estar sendo alteradas em função de tais mudanças (PESSANHA; ARAÚJO; AZEVEDO; GOMES, 2000). Por outro lado, a baía de Paraty é uma baía fechada, sendo uma das regiões costeiras mais bem preservadas do Brasil. É considerada patrimônio Mundial pela Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) que, apesar de estar sofrendo constantes impactos ambientais encontra-se em bom estado de conservação apresentando um ambiente menos impactado (FIGUEIREDO; BARRETO; REIS, 2004; WANICK; KUTTER; TEIXEIRA; CORDEIRO; SANTELI, 2011).

Alterações no padrão morfológico de um organismo podem ser consideradas um reflexo das pressões ecológicas sofridas por ele (DELBEEK; WILLIAMS, 1987). Desta forma, as características do ambiente são fatores determinantes de características morfofuncionais. O aumento da poluição nos ecossistemas aquáticos leva a alterações morfológicas e fisiológicas severas nos organismos aquáticos (VAL; AMAZÔNIA, 1999; ZHOU; ZHANG; FU; SHI *et al.*,

2008), o que tem despertado o interesse por indicadores biológicos que atestem a qualidade dos diferentes ambientes aquáticos (KUSUM; PRADESH, 2013). O termo bioindicador pode ser reconhecido como espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (ADAMS, 2002). A avaliação de bioindicadores é reconhecida como uma técnica de monitoramento ambiental, pois acrescenta informações a respeito da resposta biológica que aquele determinado ambiente apresenta na presença de diferentes tipos de poluentes (BURGEOT; BOCQUÉNÉ; PORTE; DIMEET *et al.*, 1996; AL-MADFA; ABDEL-MOATI; AL-GIMALY, 1998). Os peixes são considerados bons bioindicadores ambientais por contaminação por metais, pois estão no ápice da cadeia alimentar (HEMMADI, 2017).

Os biomarcadores são comumente utilizados como indicadores bioquímicos, fisiológicos e histológicos de exposição à xenobióticos ou de efeitos de contaminantes químicos (HUGGETT, 2018). Biomarcadores histológicos, em peixes, vêm sendo considerado um excelente método de avaliação do impacto de poluentes ambientais, pois constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos de compostos químicos em órgãos-alvo (SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997; ABDEL-MONEIM, 2013; CARVALHO-NETA; SOUSA; ALMEIDA; SANTOS *et al.*, 2014). Como ocorrem diferenças nas formas de acumular ou metabolizar os xenobióticos e nas respostas dos organismos aos seus efeitos, para tornar possível detectar efeitos biológicos nos peixes é necessário o estudo histológico de órgãos que entrem em contato direto com o agente tóxico (SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997; NORENA-BARROSO; ALVAREZ; GOLD-BOUCHOT; ZAPATA-PÉREZ, 2004).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Espécies Seleccionadas

As espécies que foram escolhidas para este trabalho pertencem à família Sciaenidae que é representada no sudeste/sul do Brasil por cerca de 26 espécies, que habitam tanto a região da plataforma continental como áreas estuarinas, apresentando grande diversidade de formas e de habitats (MENEZES, 2000). Os cienídeos, além de apresentarem o maior número de espécies na região sudeste do Brasil constituem um dos mais importantes recursos da pesca demersal (MCCONNELL, 1999). O fato destas espécies ocorrerem em diversos tipos de ambiente permite supor que ambas tenham grande plasticidade ecofisiológica e sejam tolerantes a um amplo espectro de variação de diversos parâmetros físicos e químicos da água, sendo, portanto, adequadas para o monitoramento ambiental.

Menticirrhus americanus (Linnaeus, 1758): Conhecida popularmente no Brasil como betara ou papa-terra (Figura 1) é encontrada sobre fundos arenosos e areno-lodosos em águas costeiras de pouca profundidade e em regiões estuarinas (RONDINELI; BRAGA; TUTUI; BASTOS, 2019). Estudos com cienídeos da plataforma continental brasileira, constataram que *M. americanus* é uma espécie predadora ativa de hábito alimentar principalmente carnívoro e bentófago (VAZZOLER, 1975).

Apresenta o corpo relativamente alto com coloração variando entre cinza claro e escuro, com manchas escuras. Primeira nadadeira dorsal com 10 espinhos e a posterior com 1 espinho seguido de 22 a 26 raios; anal com um espinho, caráter diagnóstico do gênero, e 6 a 8 raios. Pré-opérculo com margem denticulada, além de escamas ctenóides sobre o corpo e cabeça. Na parte anterior da mandíbula apresenta um curto e rígido barbilhão, em indivíduos menores o barbilhão apresenta-se na forma de um botão (NININ, 2008).



Figura 1. Exemplar utilizado de *M. americanus*. Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018). Escala: 4cm.

Micropogonias furnieri (Desmarest, 1823): Conhecida popularmente no Brasil como corvina (Figura 2) é um peixe característico de regiões tropicais, ocorrendo ao longo de toda costa brasileira. Esta espécie tem sido utilizada para investigação de contaminação de mercúrio em estuários brasileiros (KEHRIG; MALM; MOREIRA, 1998). A alimentação básica da corvina é constituída por alguns invertebrados marinhos e pequenos peixes (VAZZOLER, 1975).

Apresenta o corpo alongado e moderadamente comprimido, com coloração prateada sendo mais escura no dorso, que possui diversas estrias escuras oblíquas que se estendem até a região mediana do corpo, abaixo da linha lateral. Primeira nadadeira dorsal com 10 espinhos e a posterior com 1 espinho seguido de 26-30 raios; anal com 2 espinhos e 7-9 raios. Pré-opérculo serrilhado. Escamas ctenóides (ásperas ao tato) no corpo e topo da cabeça e ciclóides (lisas ao tato) no restante da cabeça (SANTANA; TEIXEIRA; CASTRO; FERNANDES *et al.*, 2016).



Figura 2. Exemplar utilizado de *M. furnieri*. Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018). Escala: 7cm.

2.2 Área de Estudo

Baía de Sepetiba

A baía de Sepetiba está localizada no sul do Estado do Rio de Janeiro, entre as latitudes 22° 53' a 23° 04' S e longitude 43° 33' a 44° 05' W, a cerca de 70 km na direção oeste da região metropolitana e abriga uma ampla variedade de habitats, como manguezais, restingas e pequenas áreas estuarinas (Figura 3). Ocupa uma área de aproximadamente 520 km², abrangendo diretamente os municípios de Itaguaí e Mangaratiba e parcialmente a zona oeste do município do Rio de Janeiro. Apresenta 43 km de comprimento e 17 km de largura no sentido norte-sul, apresentando aspecto alongado, capaz de apreender grande massa de águas salinas e salobras, com um espelho d'água de aproximadamente 305 km² de superfície e perímetro de 170,5 km de forma semi-confinada (INEA, 2009). A baía desempenha um papel importante na ecologia aquática regional, principalmente para peixes juvenis que usam a área como viveiro.

A baía de Sepetiba é intensamente contaminada por metais pesados, que em particular são despejados por grandes metalúrgicas e pela atividade agropecuária (BARCELLOS; LACERDA, 1994; FERREIRA; HORTA; CUNHA, 2010; FILHO; MAGRINI, 2017). A região apresenta indústrias desenvolvendo atividades que geram resíduos de Cd e Zn (LACERDA; WC; M, 1982). Além disto, estudos apontam que os principais fatores que provocam a poluição na baía de Sepetiba são os componentes orgânicos e os nutrientes originários dos esgotos domésticos dos efluentes industriais e dos efluentes provenientes da produção agrícola (PIZZOCHERO; TORRE; SANZ; NAVARRO *et al.*, 2019). As atividades antrópicas aliadas a introdução de materiais e

contaminantes na baía de Sepetiba estão alterando o ecossistema de acordo com (WASSERMAN; FIGUEIREDO; PELLEGATTI; SILVA-FILHO, 2001).

Baía de Paraty

A baía de Paraty é uma pequena baía localizada no interior da baía de Ilha Grande localizada na região sudeste do estado do Rio de Janeiro, exatamente no litoral sul-fluminense, fazendo divisa com São Paulo (Figura 3). Com localização geográfica 23°13'04'' de latitude sul e 44°42'47'' de longitude oeste (FCIDE, 2001), seus limites partem do complexo da baía da Ilha Grande, sul do Rio de Janeiro, estendendo-se da Ponta de Cajaíba até a Ponta Grande de Timbuiba (DHN, 2000). Possui uma área de 65.258 hectares e aproximadamente 350 quilômetros de perímetro (SKINNER; RIZZO; PEDRINI; BREVES *et al.*, 2016). É situada entre as duas maiores metrópoles do Brasil: Rio de Janeiro e São Paulo, mesmo recebendo contaminantes através da deposição atmosférica proveniente destes dois centros ela é considerada uma área não poluída (MOLISANI; MARINS; MACHADO; PARAQUETTI *et al.*, 2004; WANICK, R.; KUTTER, V.; TEIXEIRA, C.; CORDEIRO, R. *et al.*, 2011). Mesmo com a presença de fontes de contaminação, o ambiente aquático da região até então parece não sofrer impactos ambientais que gerem detrimento do ecossistema da região, e é utilizada como área de referência por ser uma área de proteção ambiental. Esta área é garantida pela Constituição Federal de 1988 como um ativo da União, destinado a salvaguardar a biota, e agora é reconhecido como Patrimônio da Humanidade pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura). Apresenta um grande potencial pesqueiro, estando ligada à preservação dos manguezais e florestas limítrofes, o que ressalta a importância da preservação destes para a economia pesqueira do município (COSTA, 1998).

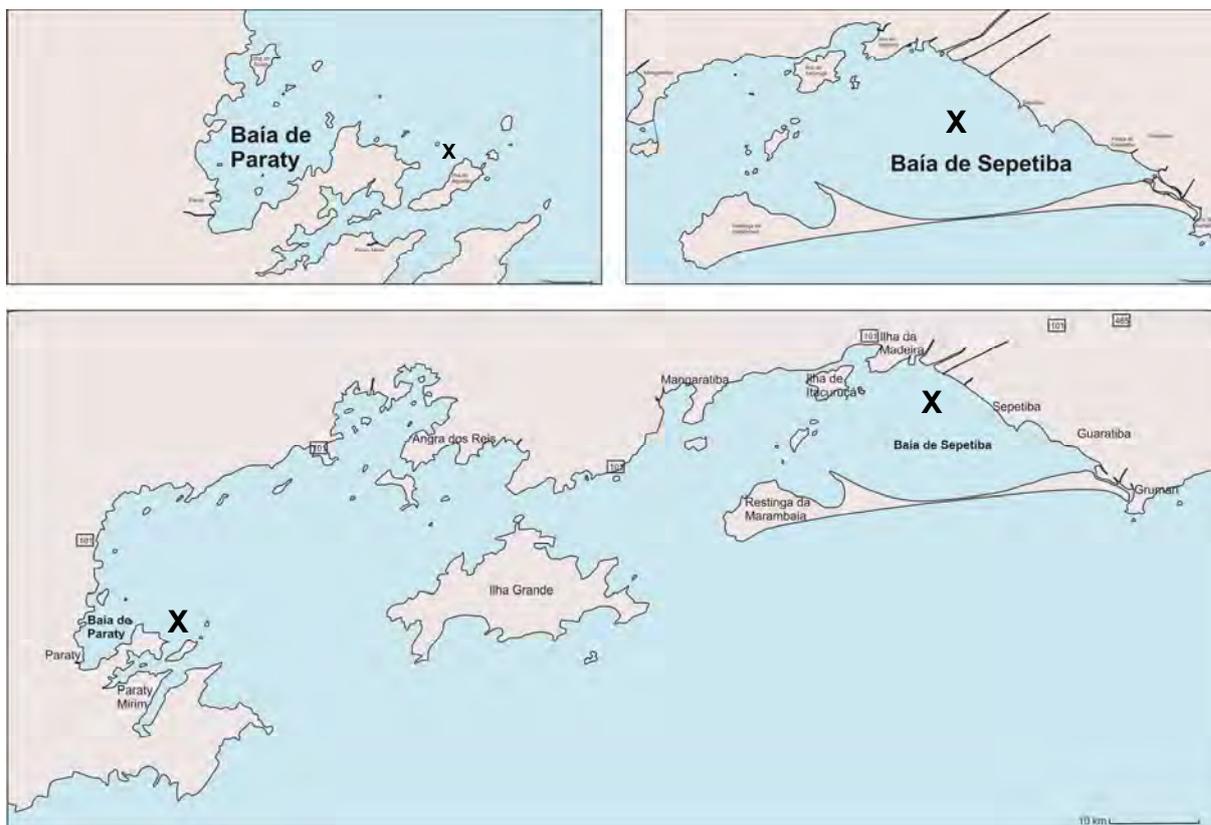


Figura 3. Áreas de estudo. Baía de Paraty e baía de Sepetiba. Fonte: Própria (2018).

2.3 Biomarcadores e Bioindicadores Histológicos

As alterações histológicas decorrentes da exposição à xenobióticos podem ser utilizadas como biomarcadores no monitoramento ambiental (HEATH, 1995; SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997; WESTER; VAN DER VEN; VETHAAK; GRINWIS *et al.*, 2002). Biomarcadores podem ser definidos como alterações bioquímicas, celulares, moleculares ou mudanças fisiológicas nas células, fluidos corpóreos, tecidos ou órgãos de um organismo que são indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico (LAM; GRAY, 2003). Eles representam uma abordagem eficaz nos estudos de análise do risco e impacto ambiental, visto que identificam os efeitos reais que estão ocorrendo em seres vivos em situações de exposição a ambientes poluídos (FREIRE; GOMES; GINUINO; ARIAS, 2008). O uso de biomarcadores é fundamental para que possam ser tomadas medidas mitigadoras e de proteção a estes ambientes poluídos, podendo ser utilizados de forma preditiva, permitindo que sejam tomadas ações de

biorremediação antes que ocorram danos ambientais e consequências ecológicas irreversíveis (CAJARAVILLE; BEBIANNO; BLASCO; PORTE *et al.*, 2000).

Tratando de ambientes aquáticos, plantas aquáticas, moluscos, crustáceos, algas, peixes, mamíferos, entre outros, podem ser objetos de estudo, sendo assim considerados bioindicadores. O termo bioindicador pode ser identificado como espécies sentinelas que são utilizados como primeiros indicadores de efeito da contaminação de seu habitat (ADAMS, 2002). A utilização de peixes nos estudos é importante devido a sua posição chave na cadeia trófica, seu elevado valor comercial, ampla distribuição geográfica e fácil aquisição. A escolha da espécie indicadora da qualidade do ambiente correta é de suma importância para o estudo, estas devem ser encontradas em vários tipos de ambientes, sugerindo grande plasticidade ecofisiológica, assim como devem ser tolerantes a uma ampla gama de variações em vários parâmetros físicos e químicos da água.

Poluentes, quando presentes no ambiente aquático, podem ser absorvidos pelos teleósteos por quatro vias, que são: alimentação, brânquias, ingestão de água e através da pele, sendo que alimentação e via branquial são as principais. Quando incorporados, os poluentes podem ser acumulados no hepatopâncreas e rim para serem biotransformados por meio de enzimas, e se tornarem hidrossolúveis sendo então excretados pelo intestino, através das fezes, pelo rim, através da urina, ou pelas brânquias (HEATH, 1995). Os peixes não possuem linfonodos e seus ossos geralmente não possuem cavidade medular. Consequentemente os órgãos filtrantes são responsáveis por remover agentes estranhos e células sanguíneas efetoras provenientes do sistema vascular são: o baço, o rim e parte do hepatopâncreas (FEIST, 2009). Assim sendo, os primeiros órgãos marcadores da poluição aquática são: brânquias, rins e hepatopâncreas. As brânquias apresentam grande área de superfície, que permanecem em contato direto com potentes poluentes. Os rins são importantes para manter a manutenção de um ambiente interno estável em relação ao equilíbrio hidroeletrolítico (água e sal), excreção e metabolismo de xenobióticos. O hepatopâncreas por apresentar grande importância no metabolismo de xenobióticos (assim como os rins) e altamente sensível a estes poluentes (HEATH, 1995).

As alterações histológicas encontradas nestes órgãos são consideradas biomarcadores de contaminação ambiental (BERNET; SCHMIDT; MEIER; BURKHARDT-HOLM *et al.*, 1999; LANG; WOSNIOK; BARŠIENĖ; BROEG *et al.*, 2006; BEN AMEUR; DE LAPUENTE; EL MEGDICHE; BARHOUMI *et al.*, 2012; CARVALHO-NETA; SOUSA; ALMEIDA; SANTOS

et al., 2014). Estas podem ser conhecidas como uma ferramenta sensível para análise dos efeitos tóxicos diretos e indiretos que afetam tecidos animais (LINS; KIRSCHNIK; QUEIROZ; CIRIO, 2010). As alterações são consequência de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HUGGETT, 2018). Biomarcadores histológicos vêm sendo utilizados para documentar e quantificar tanto a exposição quanto o efeito dos poluentes (SANTOS; GOMES; JOSÉ; PASSOS *et al.*, 2011). Porém, esta técnica não é específica para determinado tipo de contaminação, ela gera dados sobre lesões em níveis teciduais não especificando a causa exata da lesão, ou seja, realiza o diagnóstico da resposta biológica à agressão que foi causada pelo estresse (LINS; KIRSCHNIK; QUEIROZ; CIRIO, 2010).

Análises histológicas em tecidos de peixes constituem ferramentas sensíveis para detectar os efeitos tóxicos diretos de compostos químicos em órgãos-alvo e, portanto, são indicadores potentes da exposição prévia a estressores ambientais (HINTON; BAUMANN; GARDNER; HAWKINS *et al.*, 1992; SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997). As alterações traduzem a lesão integrada em função da duração e da intensidade da exposição ao elemento tóxico e a capacidade adaptativa de um determinado tecido (FERREIRA; HORTA; CUNHA, 2010). Peixes são relativamente sensíveis a mudanças no ambiente. Assim, efeitos tóxicos de poluentes podem ser evidentes em células e tecidos, antes que mudanças significativas no comportamento ou na aparência externa possam ser identificadas (VAN DYK; PIETERSE; VAN VUREN, 2007).

2.4 Órgãos Alvo

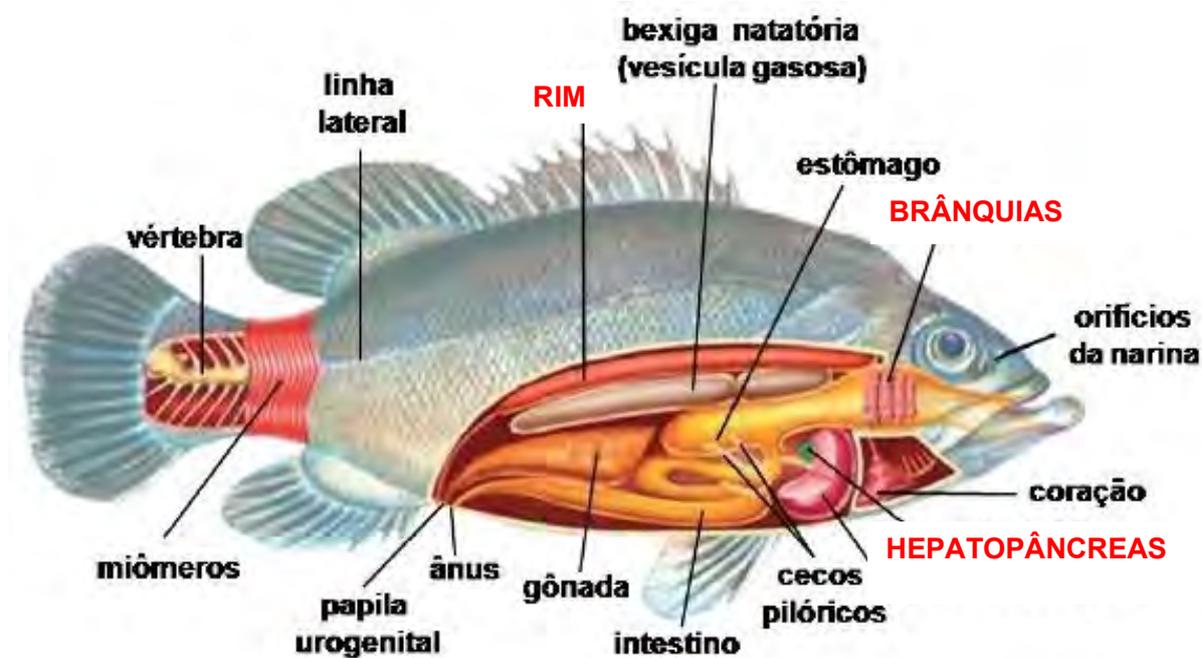


Figura 4. Ilustração da anatomia interna em peixe teleósteo. Fonte: https://www.freepik.es/vector-premium/ilustracion-de-vector-de-peces-de-anatomia_1869645.htm (2018).

2.4.1. Brânquias

A brânquia (Figura 5A) é um órgão multifuncional do sistema respiratório envolvido na troca de gases, regulação iônica, osmoregulação, equilíbrio ácido-base, excreção de amônia, produção de hormônios, modificação de metabolitos circulantes e defesa imune (ROMBOUGH, 2007). Tem origem embrionária do endoderma, sendo desenvolvidas a partir dos arcos da faringe (WARGA, R. M.; NUSSLEIN-VOLHARD, 1999). As brânquias são cobertas e protegidas pelo opérculo (placas localizadas nos lados da cabeça, antes das guelras), o mesmo protege a parte externa das brânquias e regula o movimento da água através dos filamentos (Figura 5B).

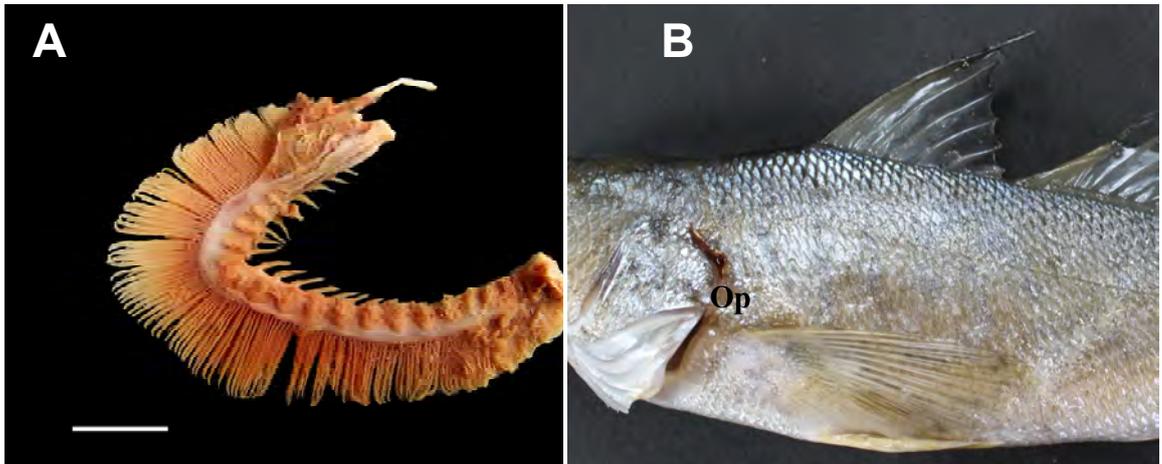


Figura 5. (A) Fotomicrofotografia da brânquia em teleósteo. (B) Fotografia indicando a localização do opérculo (Op) em teleósteo. Fotos elaboradas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018).

A maioria dos teleósteos possui quatro pares de arcos branquiais que se estendem do assoalho até o teto da cavidade bucal. Os arcos branquiais são sustentados por ossos mistos (acelular e esponjoso) e cartilagem com músculo abductor estriado associado ao músculo adutor, facilitando assim o movimento das brânquias para posições respiratórias favoráveis (SALES; SANTOS; RIZZO; RIBEIRO *et al.*, 2017).

Cada arco branquial dá sustentação a dois conjuntos de filamentos branquiais ou holobrânquias, cada uma destas duas metades é chamada hemibrânquia (Figura 6A). Cada hemibrânquia é composta por várias subdivisões delgadas chamadas de lamelas branquiais (Figura 6B), que aumentam a área de superfície disponível para o contato com o ambiente. A função destas estruturas é fornecer uma grande área de superfície que irá auxiliar a função respiratória e excretora, sendo assim responsáveis pela captação do oxigênio e pelo fluxo iônico ativo e passivo (FEIST, 2009). A forma, tamanho e densidade dos filamentos e lamelas variam bastante entre as diferentes espécies de peixes (EVANS; CLAIBORNE, 2005). Os filamentos branquiais possuem um suporte cartilaginoso central, arteríolas aferentes e eferentes e são revestidos por epitélio pavimentoso simples e uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, o qual é contíguo com o revestimento dos arcos branquiais e da mucosa oral da cavidade bucal.

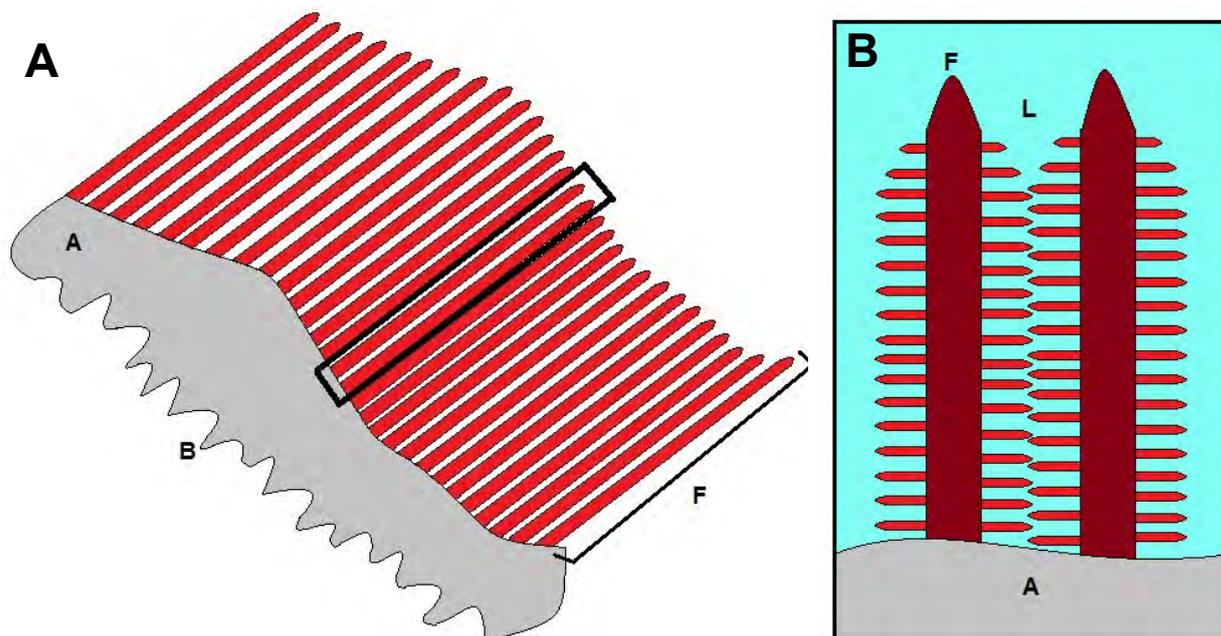


Figura 6. (A) Parte anterior do arco branquial “a” revestida pelo rastro branquial “B”, e a parte posterior com uma das duas fileiras de filamentos; (B) Lamelas “L” distribuídas ao longo do filamento “F” (adaptado de Wegner, 2012).

Representando mais de 50% da área de superfície total do animal, as brânquias apresentam uma grande área de superfície que fica em contato com a água, e em consequência da baixa capacidade de obter oxigênio da água as brânquias são irrigadas externamente por um fluxo ventilatório massivo (ROMER; PARSONS, 1985). A difusão entre água e o sangue é extremamente fina, e a eficácia da troca difusiva é maximizada pelo fluxo contracorrente (direção da corrente sanguínea nas lamelas branquiais é oposta ao fluxo da água) nos locais de troca (WITHERS, 1992). Assim sendo, as brânquias além de ser o principal local de absorção de tóxicos de origem hídrica, também é o primeiro e mais importante local de impacto tóxico (WOOD, 2001). Modificações estruturais nas brânquias têm sido amplamente utilizadas como indicadores de contaminação ambiental (CRUZ; PRADO; AGUILAR; DAVID COUTO, 2015; FONSECA; SANCHES FERNANDES; FONTAINHAS-FERNANDES; MONTEIRO *et al.*, 2016).

Histologicamente, cada arco branquial é composto por uma lamela óssea ou cartilaginosa, tendo como revestimento o epitélio estratificado pavimentoso composto por diversos tipos celulares (Figura 7A), dentre estes as células epiteliais pavimentosas, clorídricas, mucosas, botões

gustativos além do tecido conjuntivo e de apresentarem expansões chamadas rastros branquiais que atuam na proteção dos filamentos, e estão vinculados aos hábitos alimentares da espécie (EIRAS-STOFELLA, 1994). As lamelas branquiais são formadas por células pilares e respiratórias (Figura 7B), nas lamelas ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e o meio (EVANS; CLAIBORNE, 2005).

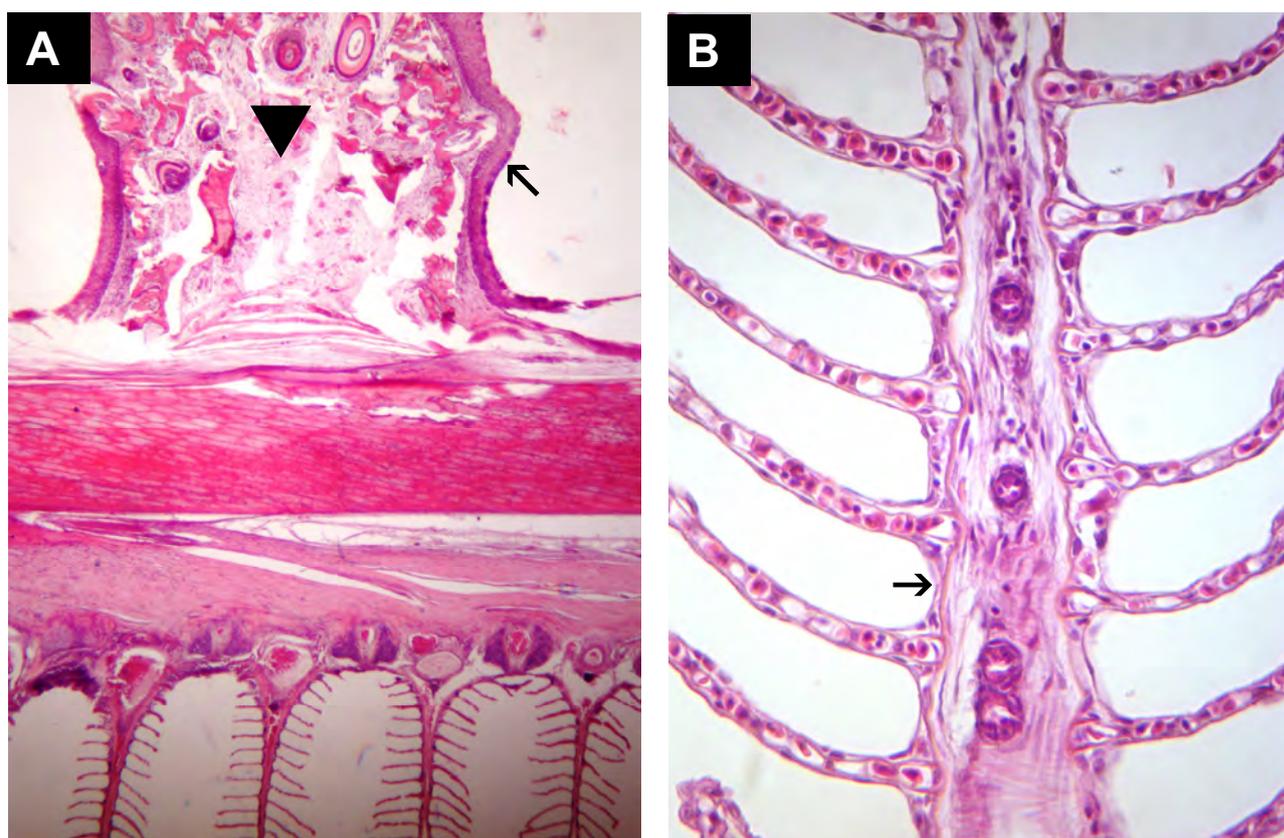


Figura 7. Fotomicrografias de brânquias. (A) Arco e rastro branquial compostos por uma lamela óssea ou cartilaginosa (▼), tendo como base o epitélio estratificado pavimentoso composto por diversos tipos celulares (↖); (B) Lamelas branquiais constituídas por um epitélio simples pavimentoso (→), composto por diversos tipos celulares. Coloração: HE. Aumentos: 150x e 1150x.

A estrutura básica das lamelas branquiais dos teleósteos consiste em uma fina camada de células que repousam na membrana basal que é apoiada por células pilares (Figura 8). Os espaços encontrados entre as células pilares são chamados lacunas, e estas lacunas interligam as arteríolas aferentes e eferentes. As células pilares são contráteis e desta forma regulam o fluxo sanguíneo. Esta constituição define a barreira para as trocas gasosas entre o sangue e a água. O epitélio

branquial é constituído principalmente por três tipos de células (pavimentosas, clorídricas e mucosas), das quais as células pavimentosas são abundantes nas superfícies lamelares (LAURENT; DUNEL, 1980; LAURENT, 1984).

Células pavimentosas (Figura 8) são geralmente grandes, poligonais e finas, e geralmente em peixes sadios cobrem toda sua superfície lamelar. Estas células são conhecidas como local de troca gasosa, movimento passivo de íons e água e por possuir papel no transporte ácido-base, especificamente na excreção de H^+ e captação de Na^+ (PERRY, 1997). A membrana apical da célula pavimentosa é revestida com glicocálix e apresenta cristas e/ou microvilosidades que auxiliam no aumento da área de superfície disponível para trocas gasosas e retenção de muco. Internamente, apresentam mitocôndrias esparsas, e são ricas em outras organelas, apresentam o complexo de Golgi bem desenvolvido, abundante retículo endoplasmático rugoso e numerosas vesículas fazendo com que as células do pavimento sejam consideradas "ativas" na regulação de íons e ácido-base (SCHLENK; BENSON, 2001).

As células clorídricas são cercadas por células pavimentosas apresentando formato colunar e núcleo situado na base da célula, são observadas na junção entre as lamelas primárias e secundárias (Figura 8). Essas células se coram fortemente com eosina e são ricas em mitocôndrias que estão ligadas a uma rede tubular do retículo endoplasmático liso. São encontradas principalmente: na região do filamento branquial que está associada à artéria branquial aferente, nas bases das lamelas branquiais e na região interlamelar (FRANKLIN, 1990). Estas células normalmente diferenciam-se a partir de células epiteliais pavimentosas do epitélio respiratório, durante o desenvolvimento das lamelas branquiais, logo estas células são mais numerosas nas brânquias em desenvolvimento do que nas brânquias do peixe adulto (BOYD, 1980).

As células mucosas (CMs) são derivadas do epitélio branquial (Figura 8) e produzem muco composto por diferentes categorias de glicosaminoglicanos, sua importância biológica abrange diversas funções como a regulação iônica, proteção mecânica e imunológica (SHEPHARD, 1982). Estas células estão presentes em baixa quantidade na região interlamelar e nas lamelas branquiais de peixes sadios (FERGUSON; MORRISON; OSTLAND; LUMSDEN *et al.*, 1992). Em condições estressantes a produção de muco parece aumentar afim de que a superfície branquial seja protegida, porém uma camada mucosa espessa bloqueará os canais de fluxo de água entre as lamelas branquiais, aumentando a distância de difusão entre a água e o

sangue (ULTSCH; GROS, 1979). As células mucosas (CMs) estão presentes no revestimento epitelial do filamento branquial, e suas respostas ao meio ambiente têm sido intensamente estudadas (HUGHES; MUNSHI, 1979; BANERJEE; CHANDRA, 2003; SUNITA; BANERJEE, 2004; DÍAZ; GARCÍA; DEVINCENTI; GOLDEMBERG, 2005; DÍAZ; GARCIA; GOLDEMBERG, 2005). Outros tipos celulares são encontrados no interstício, incluindo: melanócitos, linfócitos, macrófagos e células neuroepiteliais (LAURENT, 1984; DUTTA; DATTA-MUSHI, 1996).

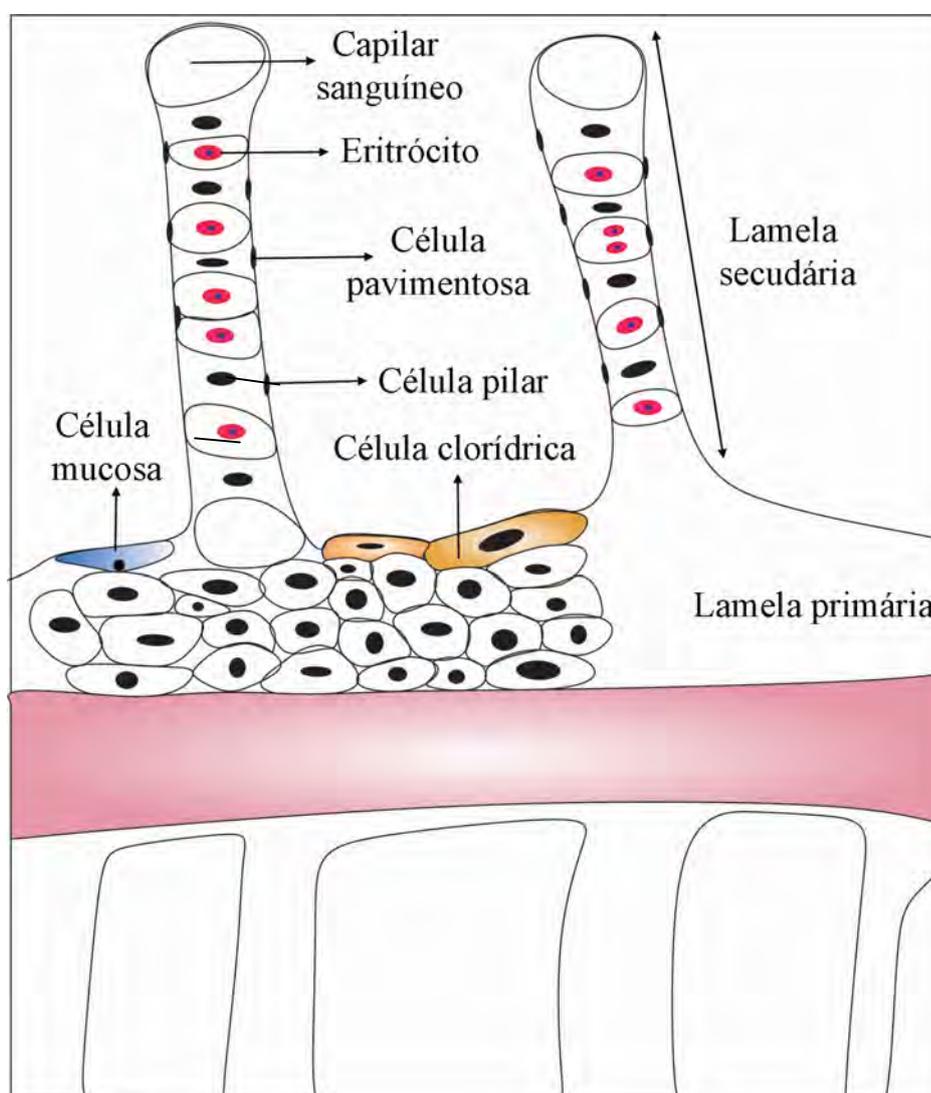


Figura 8. Diagrama demonstrando as estruturas da lamela primária e secundária das brânquias. Fonte: Própria autoria (2018).

2.4.2. Rim

O rim dos teleósteos é considerado um órgão misto, que compreende elementos hematopoiéticos, reticuloendoteliais, endócrinos e de excreção (Figura 9A). Os rins, assim como as brânquias, são responsáveis pela excreção e manutenção da homeostase corporal (EVANS; CLAIBORNE, 2005) e, além de produzir a urina atua como uma rota de excreção de metabólitos de diversos xenobióticos aos quais os peixes podem estar expostos (HINTON; BAUMANN; GARDNER; HAWKINS *et al.*, 1992). Nestes peixes, geralmente os rins estão localizados numa posição retroperitoneal (Figura 9B), próximo a coluna vertebral (PERRY; LAURENT, 1993). Apresenta coloração escura: marrom ou preta. Os rins de peixes não são divididos em zonas como medula e cortex que são encontradas em mamíferos (OGUZ, 2015). Normalmente se divide em duas regiões: anterior, de origem pronéfrica, sendo composto basicamente por elementos hematopoiéticos; e posterior, de origem mesonéfrica, composta por elementos excretores (PERRY; LAURENT, 1993). No entanto, em algumas espécies, essas regiões não são muito evidentes (REIMSCHUESSEL, 2001).

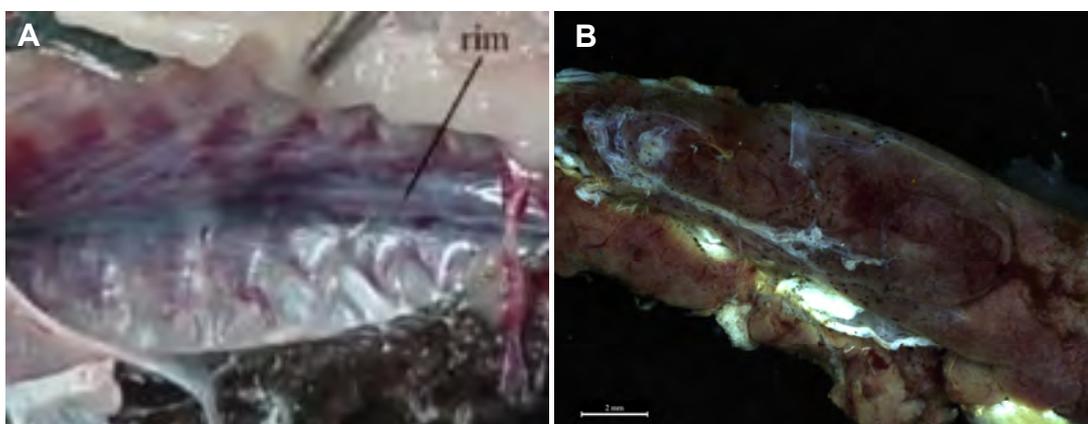


Figura 9. (A) Fotografia indicando a localização retroperitoneal do rim em peixe teleósteo; (B) Fotomacrofotografia do rim. Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ (2018).

OGAWA, (1961) constatou que o rim de teleósteos marinhos pode ser agrupado em cinco tipos (Figura 10):

1. Tipo I. As regiões anterior e posterior são completamente fundidas e não existe uma distinção clara entre elas. Esse tipo é comumente encontrado nos membros da família Clupeidae.

2. Tipo II. As regiões anterior e posterior são distintas. E as regiões média e posterior são completamente fundidas. Tais tipos são encontrados nos peixes marinhos pertencentes a Plotosidae e enguias (Anguillidae).

3. Tipo III. Apresenta a região posterior fundida, e região anterior representada por duas porções delgadas. As regiões anterior e posterior são claramente distintas. Como visto na maioria das espécies pertencentes às famílias Belonidae, Mugilidae, Cottidae, Pleuronectidae e Scopelidae.

4. Tipo IV. Neste tipo, a parte posterior do rim está fundida. Não há distinção de região anterior e posterior. É encontrado em cavalos marinhos e tubarões pertencentes à família Syngnathidae.

5. Tipo V. Neste tipo, os dois rins estão completamente separados ao longo de seu comprimento. Como em peixes pertencentes à família Lophidae.

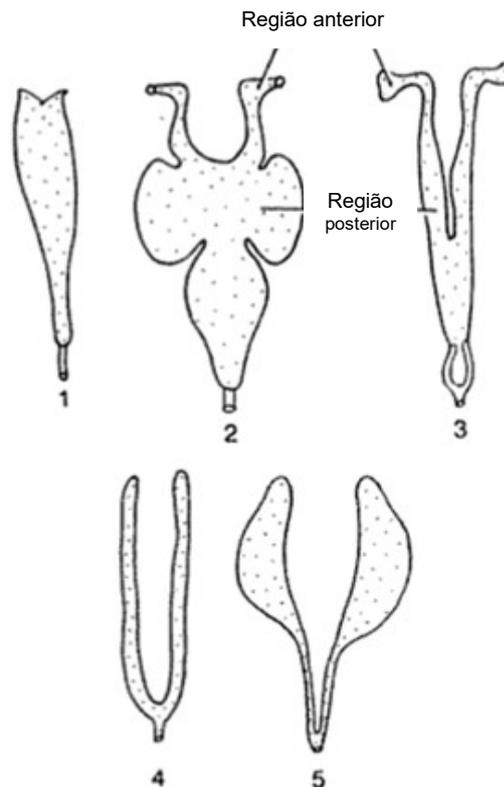


Figura 10. Ilustrações representando os 5 tipos de rim. Fonte: OGAWA, 1961.

A principal função do rim nos peixes é a regulação osmótica de água e sais, ao invés da excreção de resíduos nitrogenados como nos mamíferos. Enquanto, em peixes os resíduos nitrogenados são excretados pelas brânquias (MORRISON, 2007). A unidade funcional do rim é o néfron; e sua função é filtrar o sangue, reter e absorver a água, hormônios, nutrientes e excreção de outras substâncias no lúmen renal. O filtrado glomerular é chamado de urina (FEIST, 2009). O néfron dos peixes varia consideravelmente entre formas marinhas, eurialinas e de água doce (Figura 11), refletindo diferenças significativas entre suas funções. Contudo, apresentam uma arquitetura celular básica similar.

O néfron consiste em vários segmentos com estrutura e função específicas.

1. Corpúsculo renal (glomérulo com cápsula de Bowman) – antes de entrar na cápsula glomerular, a arteríola aferente se ramifica em capilares que irão formar o glomérulo. Estes capilares se anastomosam e deixam a cápsula como arteríola eferente. O mesângio preenche o espaço entre as alças dos capilares glomerulares. A cápsula glomerular é formada de camadas internas e externas de um único epitélio achatado. Os capilares glomerulares são envoltos por prolongamentos dos podócitos, que são as células epiteliais da camada interna. Além disso, em teleosteos, células justaglomerulares podem ser encontradas nas paredes das arteríolas aferentes, estas células contêm grânulos secretores que são responsáveis pela secreção da enzima renina (FATH-ELBAB, 2004). No corpúsculo renal é formado um ultrafiltrado de plasma a partir do sangue. Este filtrado passa para o túbulo renal, onde é alterado para formar urina.

2. Segmento do colo – este segmento é curto e reto, e desemboca no túbulo proximal; apresenta forma de sifão (OJEDA; ICARDO; WONG; IP, 2006), é constituída por células epiteliais cúbicas multiciliadas, produzindo um lúmen semelhante a uma fenda (OSTRANDER, 2000; MOKHTAR, 2017). Apesar de não ter uma função estabelecida, acredita-se que os cílios estimulem a atividade absorptiva nesta região, sendo importante também para o movimento de materiais do espaço de Bowman para o lúmen tubular (SAWYER; UCHIYAMA; PANG, 1982; OJEDA; ICARDO; WONG; IP, 2006). Consequentemente se torna importante para a realização da filtração de baixa pressão no espaço urinário e consequentemente aumentando a taxa de filtração glomerular (SAWYER; UCHIYAMA; PANG, 1982; OJEDA; ICARDO; WONG; IP, 2006).

3. Túbulos renais

Segmento proximal (primeiro segmento): apresenta seu sistema lisossômico desenvolvido, um alto teor de fosfatase ácida e um sistema tubular apical envolvido na absorção realizada por células endocíticas provavelmente relacionados a reabsorção de proteínas e outras macromoléculas (JARIAL; WILKINS, 2010). Outras prováveis funções são a reabsorção de glicose e aminoácidos, reabsorção isosmótica de sódio e cloreto, e secreção de moléculas orgânicas. Apresenta células colunares com borda em escova, núcleo grande esférico, ligeiramente basófilo e basal (MOKHTAR, 2017). O citoplasma destas células contém numerosas mitocôndrias concentradas na região basal e lisossomas secundários na região supranuclear (OJEDA; ICARDO; WONG; IP, 2006).

Segmento proximal (segundo segmento): constitui a maior região do néfron dos teleósteos. As células desta região apresentam numerosas mitocôndrias, sendo assim considerada uma região metabolicamente ativa. Regula a capacidade de produzir urina hiper ou hipotônica. Apresentam células colunares mais elevadas que o primeiro segmento, com núcleos variando de ovais a esféricos localizados centralmente, apresenta intensa borda apical em escova e o citoplasma é intensamente acidófilo. Apresenta o sistema lisossômico e baixa capacidade de endocitose, indicando que desempenha um papel mínimo na captação de macromoléculas.

Segmento intermediário: tipicamente é uma região ciliada e pode formar uma porção especializada do segundo segmento proximal.

Segmento distal: ausente em teleósteos marinhos. Apresenta células colunares baixas com núcleos ovais, sem borda em escova e coloração menos intensa que o túbulo contorcido proximal. O citoplasma apresenta mitocôndrias alongadas e numerosas invaginações do plasmalema basilar. Participa da reabsorção ativa do sódio, indicando que pode aumentar a eficiência da retenção de íons monovalentes e a diluição da urina em peixes eurialinos e de água doce (HOAR; RANDALL, 1969).

4. Túbulos coletores

Essencial para a formação de uma urina diluída através da reabsorção de íons monovalentes do filtrado. Em teleósteos marinhos, é responsável pela remoção do sódio filtrado, ou pela saída do sódio através fluido tubular. Os túbulos coletores são

constituídos por células globosas e células colunares altas, com núcleos basais sem borda em escova. Além de camada fina de músculo liso e tecido conjuntivo. As células globosas não têm sua função e origem bem descritas, mas acredita-se que são células secretoras.

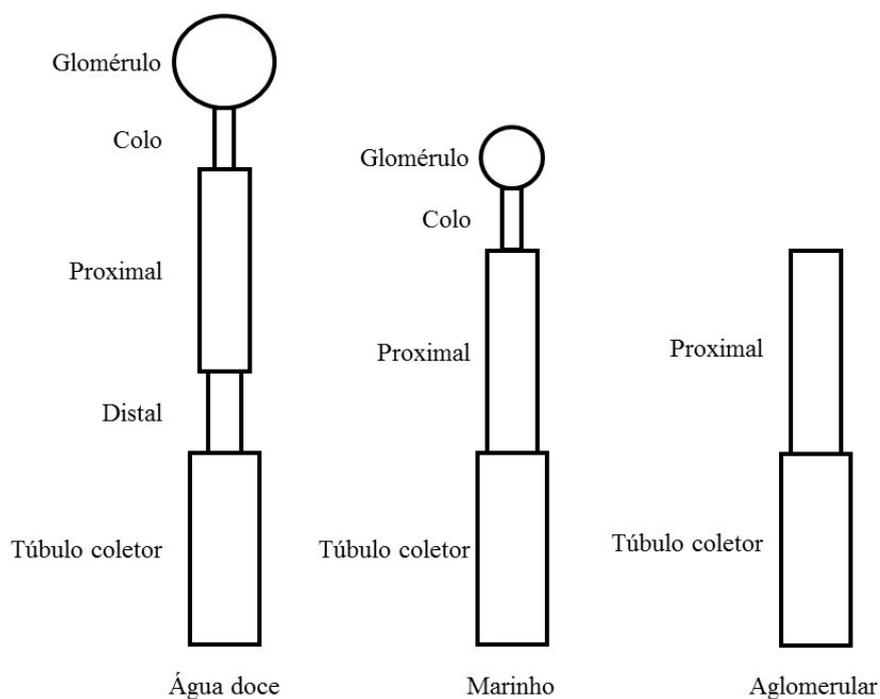


Figura 11. Néfrons típicos de teleósteos. Fonte: REIMSCHUESSEL, 2001.

Geralmente, os rins de teleósteos marinhos possuem glomérulos menos desenvolvidos do que os teleósteos de água doce. De acordo com OJEDA et al., (2006), o néfron de teleósteos marinhos geralmente consiste nas seguintes partes:

- (1) corpúsculo renal contendo o glomérulo;
- (2) um segmento de colo com segmento variável;
- (3) de 2 a 3 segmentos proximais que constituem a maior parte do néfron (a primeira delas é semelhante a nível ultraestrutural aos túbulos proximais de mamíferos);
- (4) um segmento intermediário presente entre o primeiro e o segundo segmentos proximais;
- (5) tubo coletor;
- (6) sistema de ducto coletor.

2.4.3. Hepatopâncreas

As maiores glândulas encontradas no sistema digestivo dos peixes são o fígado e o pâncreas (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). O fígado é o maior órgão que se localiza fora do canal alimentar. Geralmente apresenta coloração marrom-avermelhada, e está localizado na parte anterior do abdômen (Figura 12A). Dentre suas funções temos a assimilação de nutrientes, produção de álcool, desintoxicação, manutenção da homeostase metabólica do corpo que inclui o processamento de carboidratos, proteínas, lipídios e vitaminas. Desempenha também um importante papel na síntese de proteínas plasmáticas, tais como a albumina, fibrinogênio e sistema complemento. Em algumas espécies, tais como *M. americanus* e *M. furnieri* o tecido pancreático exócrino se desenvolve ao redor da veia porta, e então penetra no parênquima do fígado, formando assim o hepatopâncreas (ROBERTS, 1978).

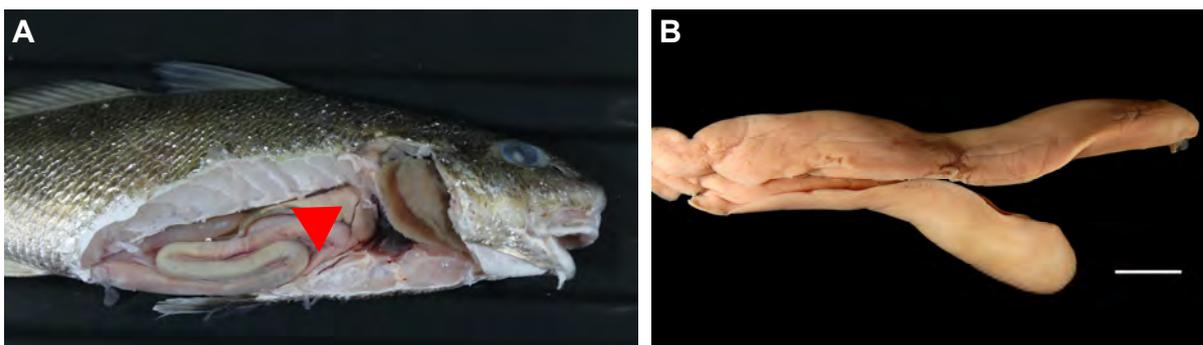


Figura 12. Macrofotografia do hepatopâncreas. (A) Indicação da localização do hepatopâncreas em teleosteo (*M. americanus*) (▼). (B) Macrofotografia do hepatopâncreas (*M. americanus*). Escala: 2cm. Fonte: Fotos realizadas no Laboratório de Polychaeta / UFRRJ.

A histologia do fígado varia entre as espécies, mas existem características gerais que são comuns a maioria das espécies (BOMBONATO; ROCHEL; VICENTINI; FRANCESCHINI-VICENTINI, 2007). O parênquima hepático é circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo propriamente dito denso modelado, de modo que ela penetra o tecido, formando septos subdividindo em lobos. É composto principalmente por cordões de hepatócitos poliédricos, com núcleos centrais distintos pela presença de cromatina com margem intensamente basofílicas, dando um aspecto denso (ROBERTS, 1978). Os sinusoides estão distribuídos irregularmente entre os hepatócitos, e são revestidos por células endoteliais, formando uma camada

citoplasmática fina. As células de revestimento sinusoidais são fenestradas e delimitam o espaço de Disse - zona entre células sinusoidais e hepatócitos - que contém microvilosidades, assim como as células de Ito. Não são encontradas células de Kupffer em teleosteos, porém em algumas espécies de peixes são encontradas células capazes de fagocitar partículas estranhas (VARIACHAK, 1938). No parênquima hepático observa-se a presença de ductos biliares e entre os hepatócitos os canálculos biliares fundem-se para produzir ductos de maior diâmetro. Os ductos biliares são formados por epitélio simples cúbico revestido por tecido conjuntivo. Os centros melanomacrofágicos presentes no hepatopâncreas apresentam conteúdo heterogêneo, geralmente concentram lipofucsina, melanina e pigmentos de hemossiderina (MOKHTAR, 2017). A estrutura hepática normalmente varia em relação direta ao sexo, idade, alimentos disponíveis ou à temperatura, e com influências endócrinas fortemente relacionadas às condições de reprodução ambientalmente reguladas (ROBERTS, 1978).

Pâncreas exócrino

Durante a ontogênese, o tecido pancreático exócrino se desenvolve ao redor da veia porta, e então penetra no parênquima hepático, ou permanece extra-hepático dependendo da espécie (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; FIGUEIREDO; BARRETO; REIS, 2004). O pâncreas extra-hepático aparece macroscopicamente com regiões de massas amareladas que se distribuem nos mesentérios ao redor do intestino, baço e bulbo intestinal. Ele também pode ser encontrado difuso no tecido hepático para formar hepatopâncreas. Neste caso o pâncreas não pode ser diferenciado macroscopicamente do fígado (MOKHTAR, 2017).

O tecido pancreático exócrino consiste em ácinos serosos dispersos. Dois tipos de células alveolares estão presentes nos ácinos; células centroacinares e células acinares típicas. As células centroacinares são poliédricas ligadas por suas extremidades basais a veia porta e seus ápices em direção ao lúmen central, representam a extremidade final do sistema de ductos pancreáticos. As células acinares típicas são de formato poliédrico, dispostas em grupamentos para formar os ácinos pancreáticos com lúmen central estreito, local no qual os produtos dessas células exócrinas são secretados. As células possuem citoplasma basofílico, núcleos basais esféricos localizados na base com nucléolo central proeminente e contém grânulos de zimogênio acidófilo, com densidade variada (KAPOOR; SMIT; VERIGHINA, 1976). Os grânulos de zimogênio contêm proenzimas

responsáveis pela digestão de proteínas, carboidratos, gorduras e nucleotídeos (MOKHTAR, 2017).

Na porção pancreática, são encontradas pequenas células ramificadas com processos citoplasmáticos no espaço perivascular e periacinar, chamadas de células estreladas pancreáticas. Também são observadas as *rodlet cells* na superfície externa do hepatopâncreas, estas células estão envolvidas na resposta imune, e são observadas em diversos órgãos de peixes (MOKHTAR, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho visa avaliar o uso dos peixes *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) e *Micropogonias furnieri* (Desmarest, 1823) como bioindicadores da qualidade ambiental das baías de Paraty e Sepetiba, localizadas no estado do Rio de Janeiro, através da detecção de possíveis alterações histológicas em brânquias, rim e hepatopâncreas destas espécies.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever o padrão histomorfológico de brânquias, rim e hepatopâncreas dos peixes *M. americanus* e *M. furnieri*.
- Analisar e classificar as possíveis alterações histológicas em cada órgão estudado nas espécies analisadas, para avaliar o uso destes como biomarcadores histológicos a exposição prévia destes a estressores ambientais.
- Realizar avaliação histoquímica da ocorrência de respostas biológicas, quanto à presença e distribuição de células que sintetizam glicoconjugados nas brânquias.
- Comparar os resultados obtidos nas análises histológicas dos órgãos destas duas espécies de ceniédeos, visando gerar dados relacionados à resposta biológica ocorrida após possível exposição de misturas de xenobióticos nestes diferentes ecossistemas marinhos localizados no Rio de Janeiro.

4 HIPÓTESE

Existem mais alterações histológicas graves nas brânquias, rim e hepatopâncreas dos peixes *M. americanus* e *M. furnieri* provenientes da baía de Sepetiba que é uma área bastante afetada pelas atividades antrópicas.

5 JUSTIFICATIVAS

O desenvolvimento deste trabalho ajudará a verificar se as espécies *M. americanus* e *M. furnieri* são modelos biológicos apropriados para o uso em biomonitoramento, das baías onde foram coletados, ao refletir em nível tecidual as condições destes ambientes.

A investigação de biomarcadores histológicos pode ser tornar uma ferramenta de baixo custo para determinar a saúde destes peixes teleósteos perciformes, da família dos cienídeos, que está dentre as espécies de maior importância comercial no Brasil, destaca-se a corvina (*M. furnieri*).

6 METODOLOGIA

No presente trabalho foram analisados cerca de 75 exemplares de peixes teleósteos marinhos das espécies *Menticirrhus americanus* e *Micropogonias furnieri*, coletados nas baías de Paraty e Sepetiba, RJ (Tabela 1). Os peixes foram coletados, por meio de parceria com pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Peixes do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Imediatamente após a coleta, os peixes foram identificados, imersos em solução contendo o anestésico hidrocloreto de benzocaína (≥ 50 mg/L), conforme (Resolução do Conselho Federal de Medicina Veterinária nº 1000/2012 para eutanásia em peixes), e posteriormente eutanasiados por hipotermia. Esta pesquisa foi conduzida sob Licença ICMBio para coleta de peixes - número do processo - 10 707.

Os peixes foram coletados entre 03/2015 – 04/2016, e fixados em formalina ainda no local da coleta, no mesmo dia, foram medidos (paquímetro analógico), pesados, dissecados para a imediata remoção dos órgãos (brânquias, hepatopâncreas e rim), a fixação dos mesmos foi realizada em formalina a 10% por 24 horas a fim de evitar alterações *post-mortem* e posteriormente, colocadas em álcool 70% dando início ao processamento histológico.

Tabela 1. Dados sobre a coleta dos peixes.

Espécie	Regiões de coleta	
	Baía de Paraty	Baía de Sepetiba
<i>M. americanus</i>	12	17
<i>M. furnieri</i>	23	23
Total de espécimes	35*	40*

* Dos espécimes coletados foram realizadas as análises dos órgãos que obtiveram total preservação das estruturas.

- Análise da Água

A análise da água foi realizada no local de coleta. Para avaliar a qualidade da água foi realizada a medição dos seguintes parâmetros físicos e químicos: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e turbidez. Com auxílio da sonda (HORIBA® mod. U-22/ *Water Quality Checker*), calibrada a cada coleta. As leituras foram feitas a profundidade de 1,0 m.

- Análises em Laboratório

Antes de prosseguir com o processamento histológico dos órgãos coletados, das duas espécies de teleósteos utilizadas, estes foram analisados macroscopicamente com o uso de estereoscópio Leica 250W e fotografados com câmera Leica DFC para obtenção de imagens que foram processadas pelo software *Leica Application Suite*, no Laboratório de Polychaeta (LAPOL) da UFRRJ. Os dados obtidos foram utilizados para correlação da descrição macroscópica com as possíveis alterações microscópicas presentes nestes órgãos.

No Laboratório da área de Histologia e Embriologia da UFRRJ, os órgãos foram retirados e submetidos às demais etapas do processamento histológico de rotina para a impregnação e inclusão em parafina-Histosec (Merck). Neste estudo, cortes histológicos transversais de 4 µm espessura de cada órgão estudado foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE) para descrição histológica dos órgãos; as brânquias foram submetidas a métodos histoquímicos do Alcian Blue (AB) pH 2.5 e do Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS) para detecção de células mucossecretoras de glicoconjugados ácidos e neutros, respectivamente, além da realização da técnica de tricrômico de Gomori (TG) para diferenciar fibras colágenas no tecido conjuntivo, ou diferenciar fibras musculares lisas e fibras colágenas; os rins foram submetidos ao método histoquímico do Ácido Periódico-Reativo de Schiff (PAS) para identificação do túbulo proximal com borda em escova; o hepatopâncreas foi submetido a técnica histoquímica de PERLS a fim de demonstrar sais férricos no tecido, marcando a hemossiderina (corada em azul), esta técnica vem sendo empregada em estudos ambientais nos quais contaminantes são avaliados (SLANINOVA; MÁCHOVÁ; SVOBODOVA, 2014), método de Gomori para detecção de fibra reticular e tricrômico de Gomori (TG) para diferenciar tecido conjuntivo, músculo e fibras colágenas.

A quantidade de células mucossecretoras ácidas e neutras foram determinadas com microscópio de luz a 40 X para cada espécime, a quantificação foi realizada através do exame de 3 regiões do filamento branquial (base, meio e ápice), 4 filamentos por seção, 3 seções separadas por pelo menos 4 seções intervalares. Cada região examinada consistiu de 10 lamelas adjacentes e seus espaços interlamelares associados em cada lado do filamento. Isso representou um total de 36 medições por brânquia.

Para a realização da microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram utilizados fragmentos das amostras de brânquias, hepatopâncreas e rim, estes foram fixados logo após a eutanásia, em solução de cacodilato de sódio 0,1M com glutaraldeído e armazenados até o

momento da inclusão. O processamento foi realizado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), no Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Díptera e Hemíptera. As amostras foram lavadas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3) por três vezes e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,3) por 2 horas a 4°C. O excesso de tetróxido de ósmio foi retirado com lavagens sucessivas em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,3). As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool por 10 minutos e posteriormente foram embebidas em epon. As amostras foram incluídas em moldes de silicone em posição sagital aos filamentos. Após a polimerização da resina foram realizados cortes ultrafinos e colocados sobre grades de cobre. As amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão e as imagens capturadas pelo software *Imaging System*.

Análise de alterações histológicas - As alterações histológicas específicas em cada órgão analisado, foram avaliadas através do cálculo do valor médio de alteração (VMA), com base na incidência de lesões, de acordo com (SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997) e por meio do cálculo do índice de alterações histológicas (IAH), com base na severidade de cada lesão, de acordo com (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

As alterações em cada órgão foram classificadas em estágios progressivos de dano ao tecido: alterações do estágio I, que não alteram o funcionamento normal do tecido; estágio II, que são mais graves e prejudicam o funcionamento normal do tecido; e estágio III, que são muito graves e causam danos irreparáveis. O valor de VMA foi calculado para cada animal pela fórmula: $VMA = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$ onde I, II e III correspondem ao número de alterações dos estágios I, II e III, respectivamente. Valores de VMA entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicam dano leve ao órgão; valores entre 21 e 50 indicam mudanças moderadas no órgão; valores entre 50 e 100 indicam lesões graves e valores acima de 100 indicam dano irreversível ao órgão (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

A porcentagem de cada alteração observada no tecido branquial das duas espécies de peixes coletadas em cada baía foi calculada dividindo-se o número de peixes apresentando uma determinada alteração dividida pelo número total de peixes avaliados.

A quantidade de células mucosas por indivíduo foi determinada em microscópio de luz (40x) analisando três regiões dos filamentos (base, meio e ápice), quatro filamentos por seção e três seções separadas por pelo menos quatro seções de intervalo (LEDY; GIAMBÉRINI; PIHAN, 2003). Cada região examinada compreendia 10 lamelas adjacentes e seus espaços interlamelares associados em cada lado do filamento. No total, 36 medições foram realizadas por indivíduo. As seções foram examinadas no microscópio Hund H600 Wetzlar x40.

Análise estatística - Para cada parâmetro, as diferenças entre os locais e espécies, foram testadas para comparar as diferenças significativas utilizando teste t binomial para amostras independentes ou o teste de Mann-Whitney. Foi utilizada a correção de Bonferroni para ajustar os valores de p com o objetivo de minimizar o erro do tipo I. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas *GraphPad Prism* versão 5.0 (*GraphPad* software, Inc., 2007) e *Statistic* versão 7.0 (StaSoft, Inc, 2005).

- Observações e fotomicrografias

Todos os cortes histológicos foram observados e fotomicrografias foram feitas com câmera digital Sony DSC - W230 acoplada ao microscópio Olympus BX 41. O aumento das fotomicrografias foi obtido pela medição da imagem com o uso de lâmina micrométrica para microscópio biológico comparando o tamanho da imagem sem zoom com a que foi utilizado o zoom da máquina fotográfica e por regra de três, foi visto quantas vezes foi aumentado.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO DA ANÁLISE DA ÁGUA

De acordo com a resolução CONAMA n. 357 - que define os limites de parâmetros, ou indicadores, para indicadores relacionados a dados sobre a proteção de comunidades aquáticas (classe 1) -, as concentrações de oxigênio dissolvido (OD) não devem registrar menos que 5 mg / L -1 para 40 NTU turbidez e o pH deve ser mantido entre 6,5 e 8,5.

O oxigênio dissolvido (OD) é a quantidade de oxigênio medida em miligramas ou milímetros dissolvidos em um litro de água. Os níveis de oxigênio são comumente altos nas águas superficiais, em especial em águas costeiras. A superfície do mar e estuários permite o ganho de oxigênio através de troca atmosférica, e da luz que penetra na superfície da água e permite que o processo de liberação de oxigênio da fotossíntese aconteça (CCME, 1999). Alguns autores utilizam o monitoramento do OD como indicação da qualidade da água em áreas costeiras e estuarinas (HUGHES; BALLINTIJN, 1968; PRASHANT; ABDSALAM; KHALIFA, 2009).

O valor de pH é uma medida da acidez da água. É importante a medição desse parâmetro para o controle da poluição, pois possui um profundo efeito no metabolismo dos organismos aquáticos (BOYD, 1995).

A turbidez é uma propriedade ótica da água, na qual materiais suspensos e alguns materiais dissolvidos, como argila, fazem com que a luz seja espalhada e absorvida em vez de transmitida em linhas retas (GILVEAR; PETTS, 1985).

As baías de Sepetiba e Paraty apresentaram concentrações médias de OD e valores de pH dentro dos limites determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nas coletas realizada. Os valores de turbidez foram maiores na baía de Sepetiba, embora não tenham excedido o limite estabelecido pelo CONAMA de 40 UNT. Por outro lado, a baía de Paraty apresentou valores de turbidez abaixo do limite estabelecido. Os resultados da análise física e química da água realizada nos locais de amostragem são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Média e desvio padrão dos dados analisados da água dos locais de coleta.

Parâmetros	Baía de Sepetiba		Baía de Paraty	
	Média	DP	Média	DP
Temperatura (°C)	27.24	±0.22	28.03	±0.09
OD	6.4	±0.26	5.91	±0.16
Ph	8.5	±0.06	8.65	±0.05
Turbidez	10.4	±1.37	1.58	±0.33

Atualmente, vem sendo observado um aumento da concentração de metais pesados e nutrientes em águas naturais receptoras de resíduos municipais e industriais. A composição química da água é proveniente da interação entre vários fatores, dentre eles: intensidade e composição das águas pluviais que caem no estuário; reações químicas que ocorrem entre água e solo; poluição na baía, como despejo industriais e práticas agrícolas inadequadas (DILLON; KIRCHNER, 1975). Assim, a determinação do grau de poluição, com relação a esses parâmetros químicos, é de grande importância para as autoridades locais e para os ambientalistas (SAMANIDOU; PAPADOYANNIS; VASILIKIOTIS, 1991).

Estudos anteriores (WASSERMAN; FIGUEIREDO; PELLEGATTI; SILVA-FILHO, 2001; MOLISANI; MARINS; MACHADO; PARAQUETTI *et al.*, 2004; PIZZOCHERO; TORRE; SANZ; NAVARRO *et al.*, 2019) sobre sedimentos e qualidade da água na baía de Sepetiba mostraram uma contaminação significativamente maior por metais pesados. No presente estudo os parâmetros analisados estavam dentro dos limites estabelecidos pelo CONAMA nas baías de Paraty e Sepetiba, com isto as alterações histológicas poderiam ser causadas pela presença de metais pesados na água. Esse resultado pode confirmar a hipótese de que a baía de Sepetiba está sob alto risco de contaminação química por metais pesados, detergente etc.

CAPÍTULO I

Alterações histológicas observadas em brânquias de peixes como biomarcadores dos impactos ambientais nas Baías de Paraty e Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

O uso de espécies de peixes como bioindicadores é uma importante ferramenta de monitoramento ambiental. Os biomarcadores histológicos são adotados para avaliar as condições de saúde de diferentes organismos e para indicar sinais de alerta de risco ambiental. A histologia pode ser aplicada como um método eficaz para analisar os efeitos de poluentes e outros estressores. Nesse sentido, as alterações histológicas das brânquias foram analisadas para avaliar a adoção das espécies de peixes *Menticirrhus americanus* (LINNAEUS, 1758) e *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823) como bioindicadores para medir a qualidade ambiental nas baías de Paraty e Sepetiba, no Estado do Rio de Janeiro. No total, 58 peixes foram coletados nas baías citadas acima. Com base nos resultados, foi observado que a baía de Paraty apresenta bom estado de conservação, enquanto a baía de Sepetiba está poluída. As espécies coletadas na baía de Sepetiba apresentaram lesões como elevação epitelial, aneurisma e necrose nas brânquias; assim, foi possível concluir que os biomarcadores histológicos podem ser utilizados como bioindicadores para medir o impacto ambiental nessas baías.

Palavras-chave: morfologia; estuário; sciaenidae; células mucosas.

ABSTRACT

Fish species use as bioindicator is an important environmental monitoring tool. Histological biomarkers are adopted to assess the health conditions of different organisms and to indicate warning signs of environmental hazard. Histology can be applied as an effective method to analyze the effects of pollutants and other stressors. Accordingly, histological gill changes were analyzed in order to assess the adoption of fish species *Menticirrhus americanus* (LINNAEUS, 1758) and *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823) as bioindicator to measure environmental quality in Paraty and Sepetiba bays, Rio de Janeiro State. In total, 58 fish were collected in the assessed bays. Based on the results, Paraty bay is in good conservation state, whereas Sepetiba bay is polluted. Species collected in Sepetiba bay showed lesions such as epithelial lifting, aneurysm and necrosis in the gills; thus, it was possible concluding that histological biomarkers can be used as bioindicators to measure the environmental impact in these bays.

Keywords: morphology; estuary; sciaenidae; mucous cells.

8.1 Objetivos Específicos

- Descrever o padrão histomorfológico das brânquias dos peixes *M. americanus* e *M. furnieri*.
- Analisar e classificar as possíveis alterações histológicas para avaliar das brânquias, nas espécies analisadas, como biomarcador histológico da exposição prévia a estressores ambientais.
- Avaliar histoquimicamente a ocorrência de respostas biológicas, quanto à presença e distribuição de células que sintetizam glicoconjugados nos órgãos estudados.
- Comparar os resultados obtidos nas análises de alterações histológicas das brânquias destas duas espécies de cianídeos.

8.2 Resultados

Análise histológica

As espécies estudadas apresentam estrutura compatível com o padrão histomorfológico observado entre elas (Figura 13).

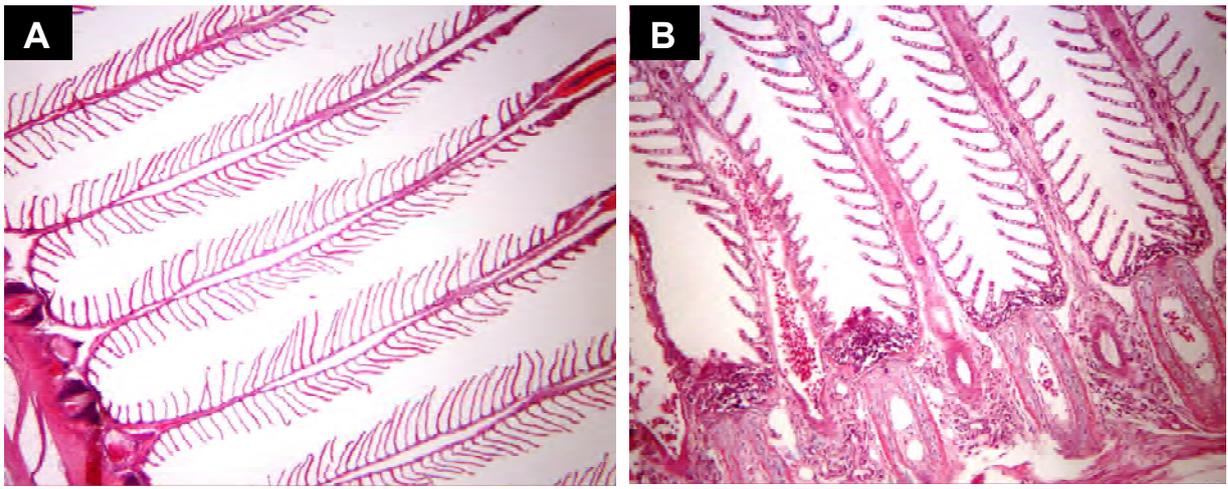


Figura 13. Padrão histomorfológico. (A) *M. furnieri*. (B) *M. americanus*. Coloração: HE. Aumento: 150 x.

As lamelas secundárias se originam nas superfícies superior e inferior das lamelas primárias e são orientadas perpendicularmente aos filamentos (Figura 14). O epitélio simples pavimentoso que reveste as lamelas secundárias é sustentado por células pilares. As células pilares controlam o diâmetro das lacunas (espaço localizado entre as células pilares), regulando o fluxo sanguíneo. O epitélio delgado permite a proximidade do sangue com o ambiente externo, promovendo a troca eficiente do oxigênio e absorção de resíduos metabólicos solúveis. Outros tipos celulares também podem ser encontrados nas lamelas primárias e secundárias, tais como: células mucosas, endoteliais, clorídricas, entre outras (Figura 14).

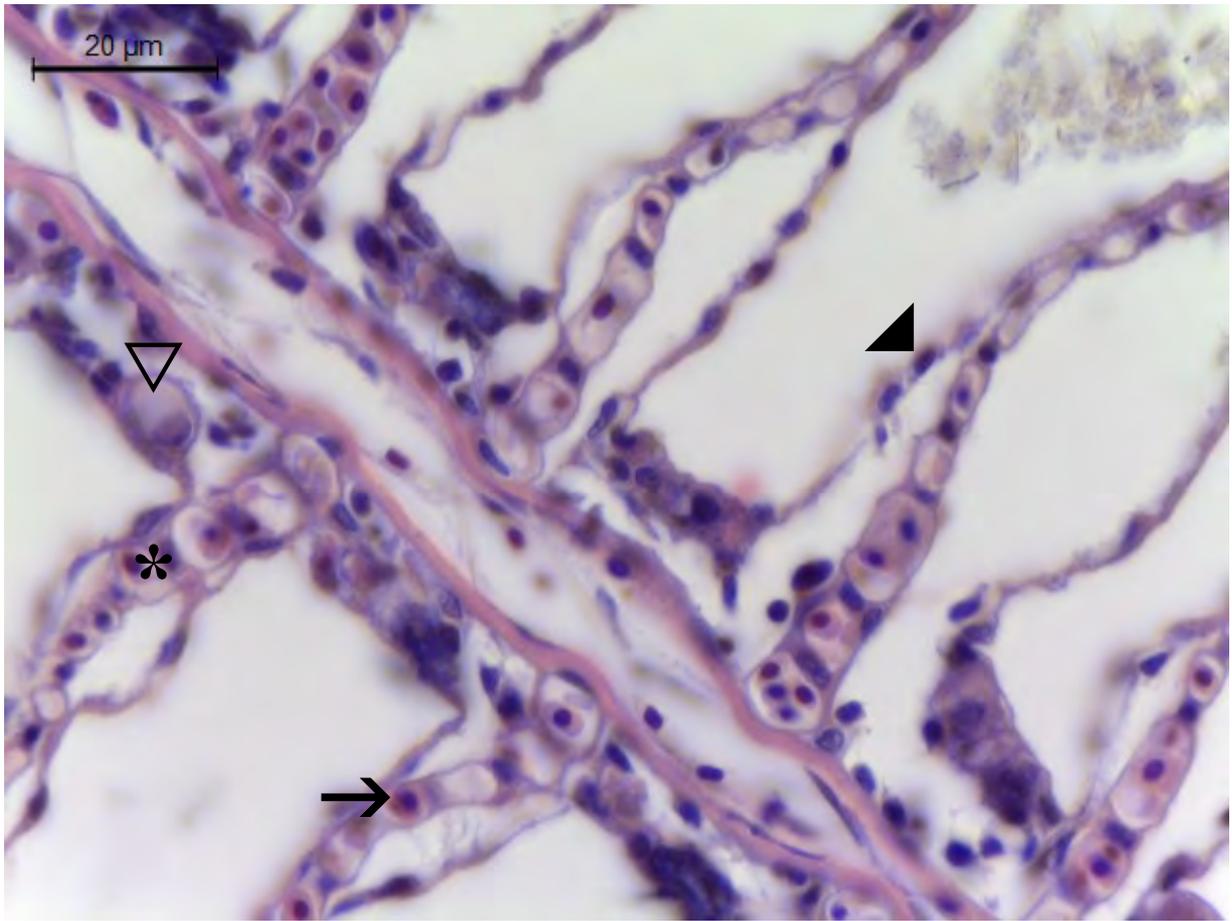


Figura 14. Lamela primária e lamela secundária, compostas por diversos tipos celulares: células epiteliais (▲), célula pilar (*), eritrócitos (→), célula clorídrica (▽). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

Os arcos branquiais são sustentados por osso misto (acelular e esponjoso) e cartilagem com músculos abdutores e adutores estriados associados a fim de facilitar o movimento das brânquias (Figura 15).

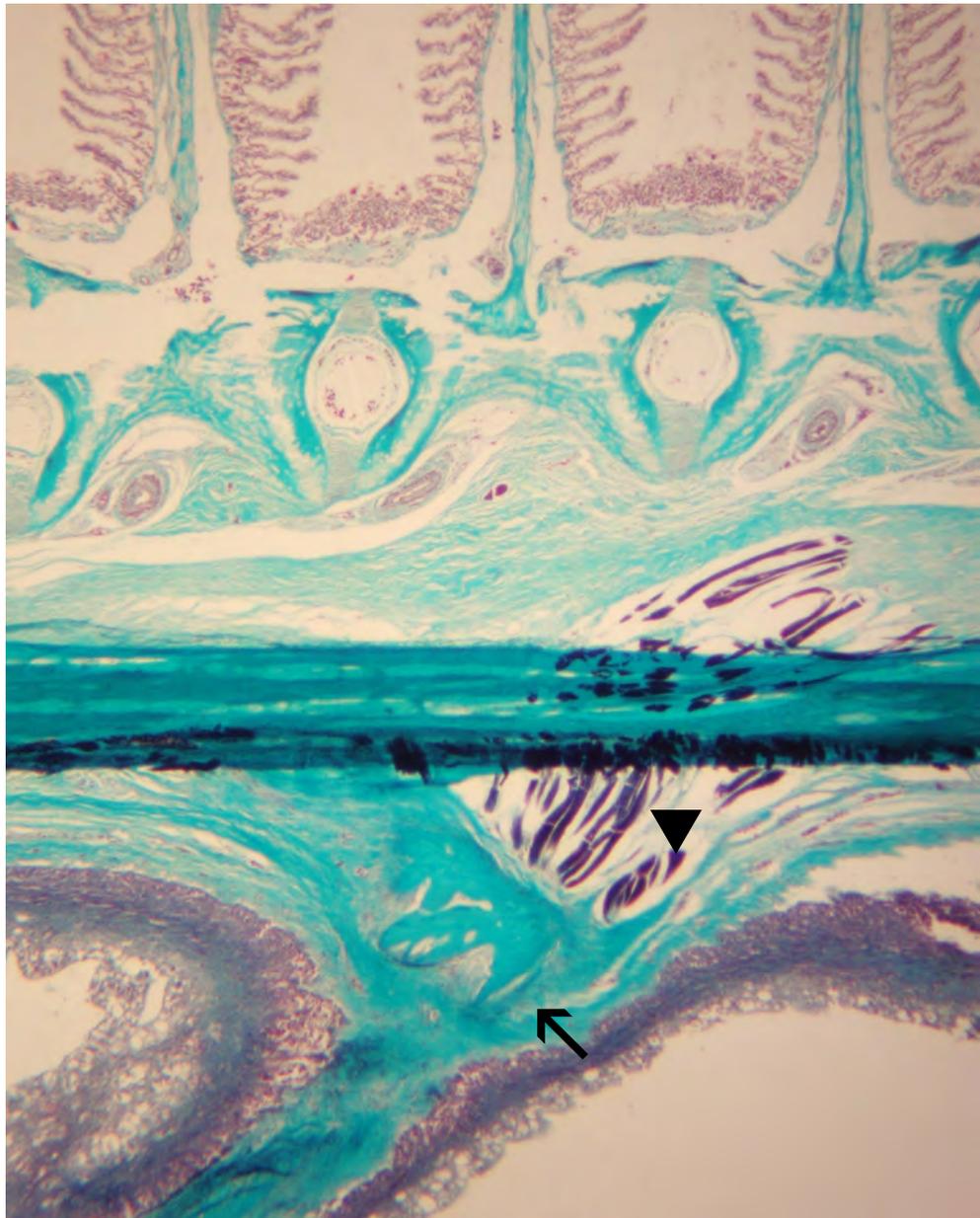


Figura 15. Fotomicrografia do arco branquial de *M. furnieri*. Fibras musculares em vermelho róseo () e colágeno em azul (). Coloração: TG. Aumento: 300x.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Células epiteliais pavimentosas (Figuras 16A, B e D) apresentam ultraestrutura complexa, incluindo retículo endoplasmático abundante e aparato de Golgi com matrizes densas associadas de vesículas, sugerindo assim uma intensa reciclagem de membranas (LAURENT, 1984). As células pavimentosas apresentam características ultraestruturais que apontam uma alta atividade metabólica (OLSON; FROMM, 1973; LAURENT; DUNEL, 1980; LAURENT, 1984) e foram implicadas na regulação ácido-base (WILSON; LAURENT; TUFTS; BENOS *et al.*, 2000).

As células clorídricas (Figura 16B) estão distribuídas nos filamentos e regiões interlamelares dos animais, e estão envolvidas no transporte de íons. A característica mais evidente morfológica destas células é o formato elíptico com presença de mitocôndrias, sistema tubular eletrodense, apresentando um sistema calicular endoplasmático extremamente bem desenvolvido que é típico por causa de sua cripta na membrana apical, e membranas bem definidas (ZADUNAISKY, 1996). As intensidades da coloração das células clorídricas estão relacionadas à densidade de unidades (alfa) da enzima Na^+/K^+ ATPase e indiretamente reflete a atividade das mesmas.

Células mucosas (Figura 16C) são desenvolvidas, apresentam citoplasma extenso, apresentando-se restrito a porção periférica da célula. São compostas principalmente por glóbulos mucosos ligados a membrana, são compactos, podendo ser poligonais ou redondos apresentando eletrodensidades variadas e aspecto fibroso (DÍAZ; M GARCÍA; DEVINCENTI; GOLDEMBERG, 2001).

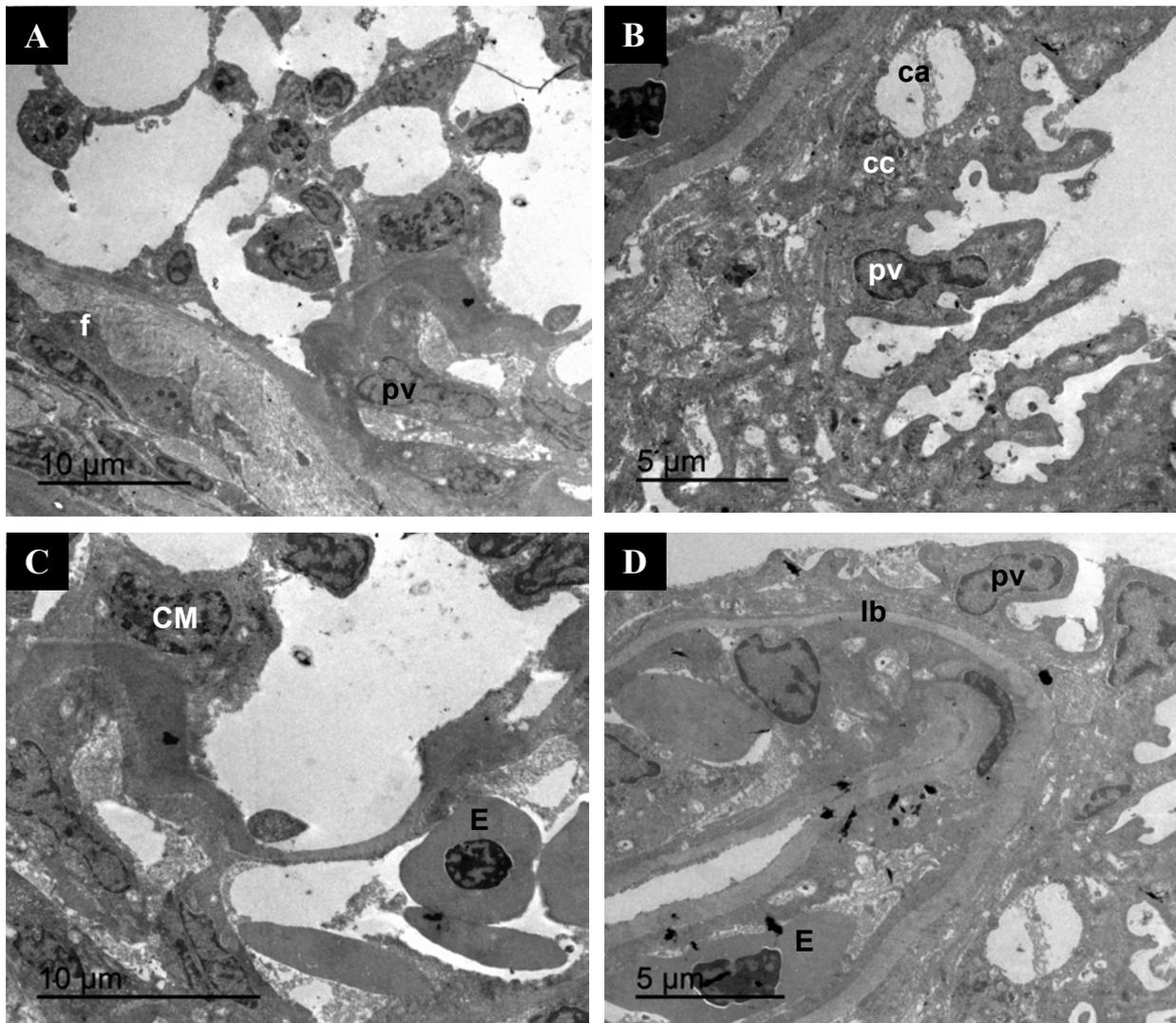


Figura 16. Microscopia Eletrônica de Transmissão da brânquia de *M. furnieri*. (A) Célula pavimentosa - pv; fibrócito - f; (B) Cripta apical - ca da célula clorídrica; célula clorídrica - cc; célula pavimentosa - PV; (C) Eritrócito - e; célula mucosa – CM; (D) Lâmina Basal – lb; eritrócito – e; célula pavimentosa - pv.

Alterações histológicas

As alterações histológicas nas brânquias foram classificadas de acordo com as alterações propostas por FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011 no qual ocorre a divisão em três diferentes estágios, de modo que as alterações são agrupadas de acordo com os níveis modificação da arquitetura tecidual. Assim podem ser observados: **estágio I:** edema intersticial, infiltração

leucocitária, hiperplasia epitelial, fusão lamelar, vasodilatação, congestão lamelar; **estágio II**: deslocamento epitelial; **estágio III**: aneurisma e necrose.

- **Deslocamento epitelial e edema:** é caracterizado pelo deslocamento do epitélio de revestimento das lamelas secundárias, em que a formação de um espaço chamado edema ocorre. É um tipo de alteração cuja proporção é variável (Figura 17).

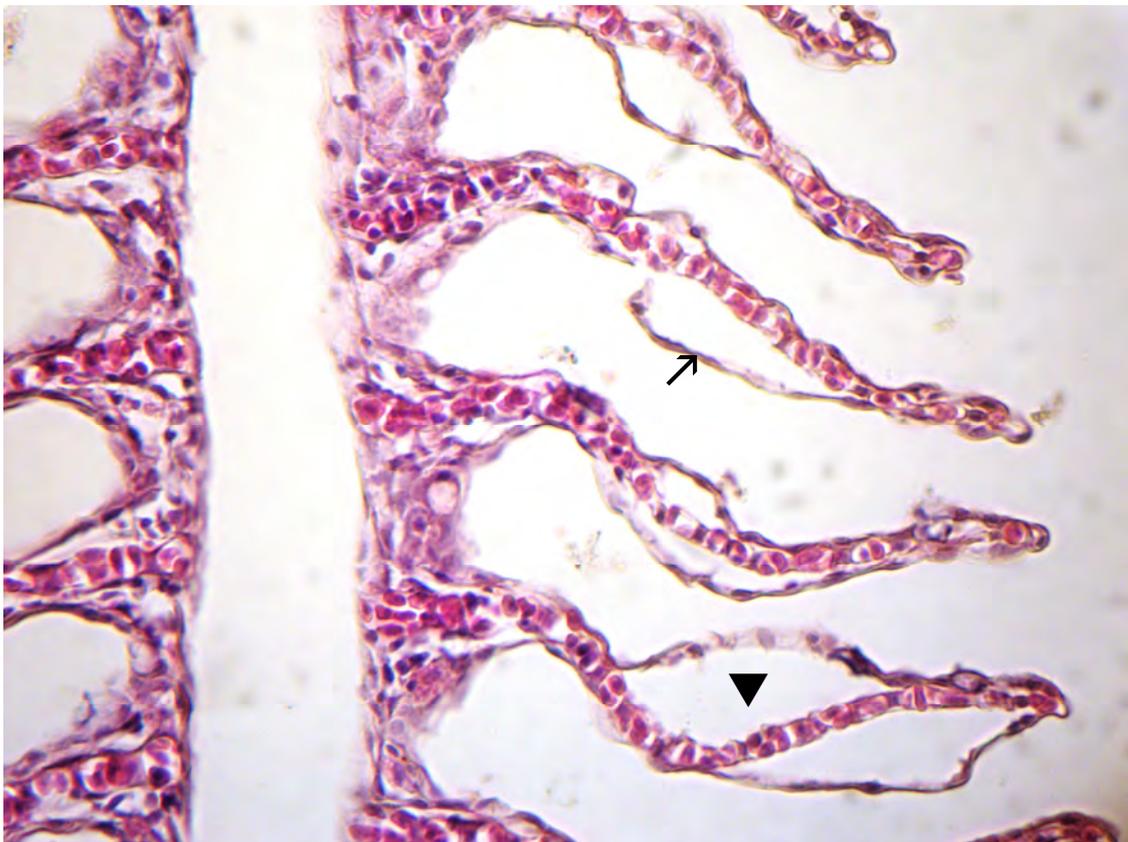


Figura 17. Presença de áreas de desprendimento epitelial (↗) de modo irregular e formação de edema (▼). Algumas células se desprendem em sua porção apical e outras em sua porção basal. Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Infiltração leucocitária e congestão lamelar:** O infiltrado inflamatório ou leucocitário consiste em glóbulos brancos que deixam o sangue e entram (infiltram-se) numa área com processo inflamatório. A congestão lamelar consiste na presença de hemácias nucleadas no lúmen das lamelas (Figura 18).

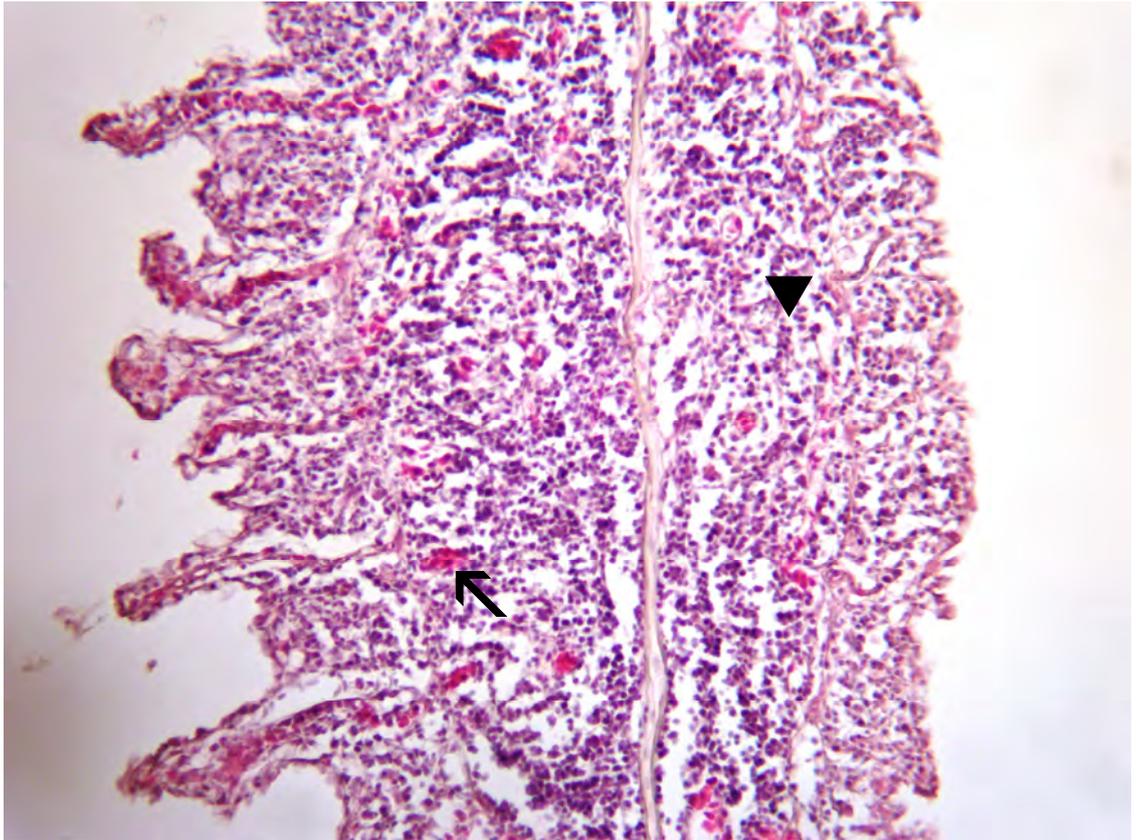


Figura 18. Aglomerado de células inflamatórias (▼) e hemácias (↖). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Hiperplasia lamelar e vasodilatação:** consiste em uma alteração no tamanho e/ou na proporção das células, podemos sugerir que seja uma área de regeneração, na qual serão observadas figuras de mitose. Na vasodilatação podemos notar um aumento do diâmetro da luz dos vasos, de modo que o vaso apresenta um maior calibre quando comparado a outros vasos (Figura 19).

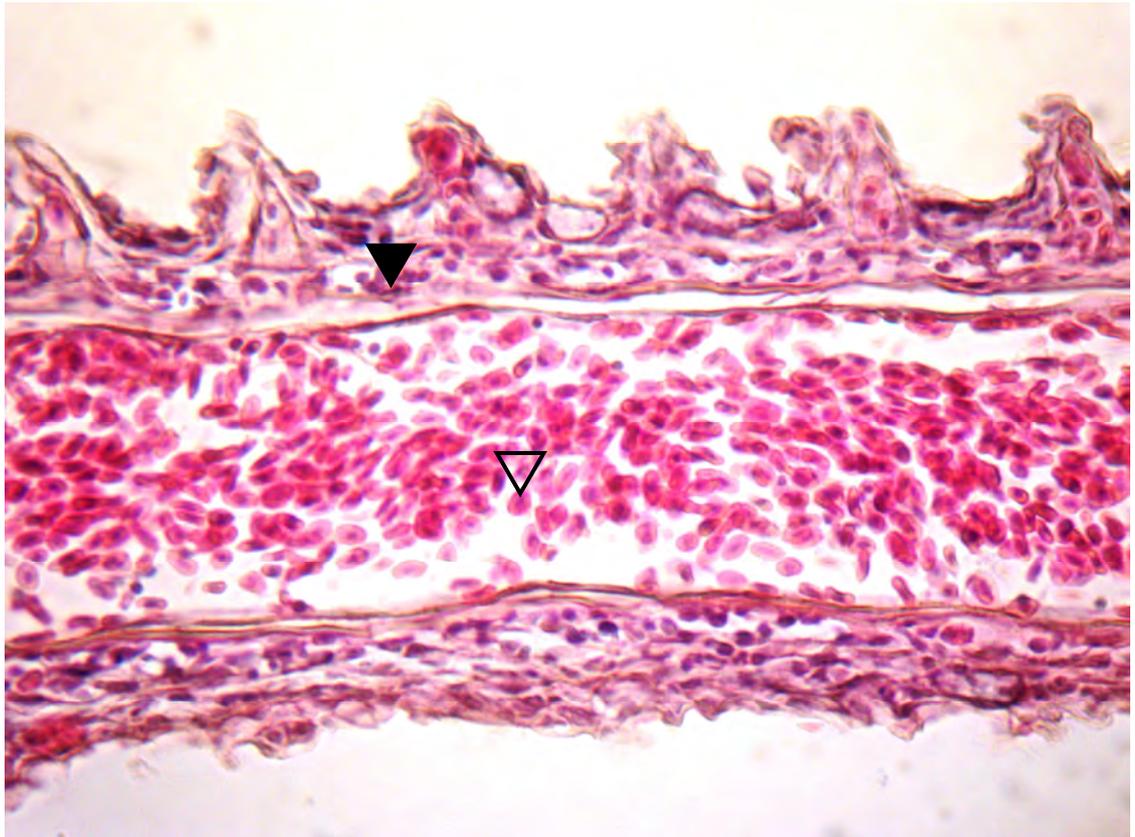


Figura 19. Proliferação do epitélio de revestimento (▼), o qual encontra-se, intensamente, eosinofílico e presença de um aglomerado de células sanguíneas na porção interna da lamela (▽). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Fusão lamelar:** é provavelmente causada por hiperplasia lamelar grave; assim, pode levar à fusão parcial ou total dos capilares lamelares dentro de uma massa epitélio hiperplásica (Figura 20).

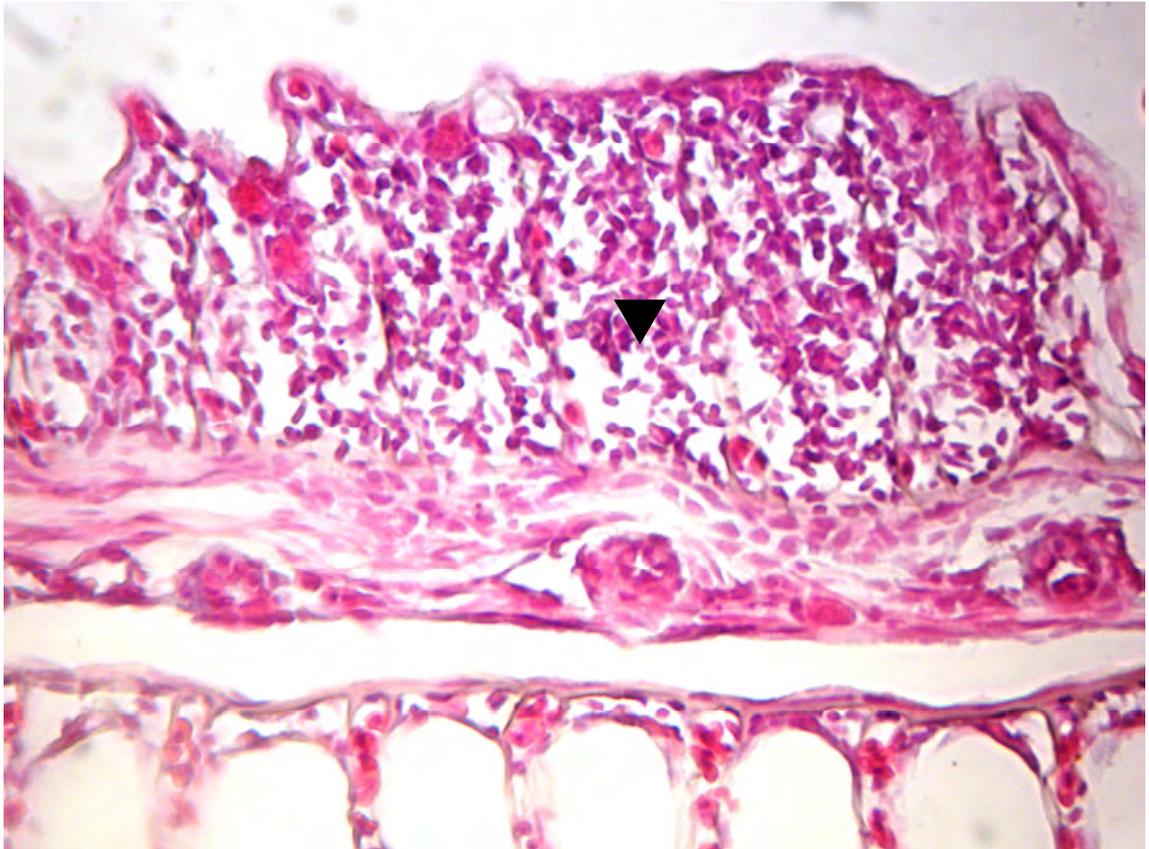


Figura 20. Perda focal da organização da arquitetura da lamela secundária (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Aneurisma:** alteração que pode ser caracterizada através da dilatação anormal de um vaso sanguíneo, provocado pelo enfraquecimento das paredes do vaso (Figura 21).



Figura 21. Presença de dilatações lamelares associadas a aglomeração de hemácias frente a um extravasamento destas no interior das lamelas (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Necrose:** alteração caracterizada por graves alterações no núcleo celular, a picnose (retração e adensamento do núcleo), cariorexia (fragmentação do núcleo picnótico) e cariólise (coloração nuclear pálida e fraca). O citoplasma sofre previamente alterações deixando-o eosinofílico (Figura 22).

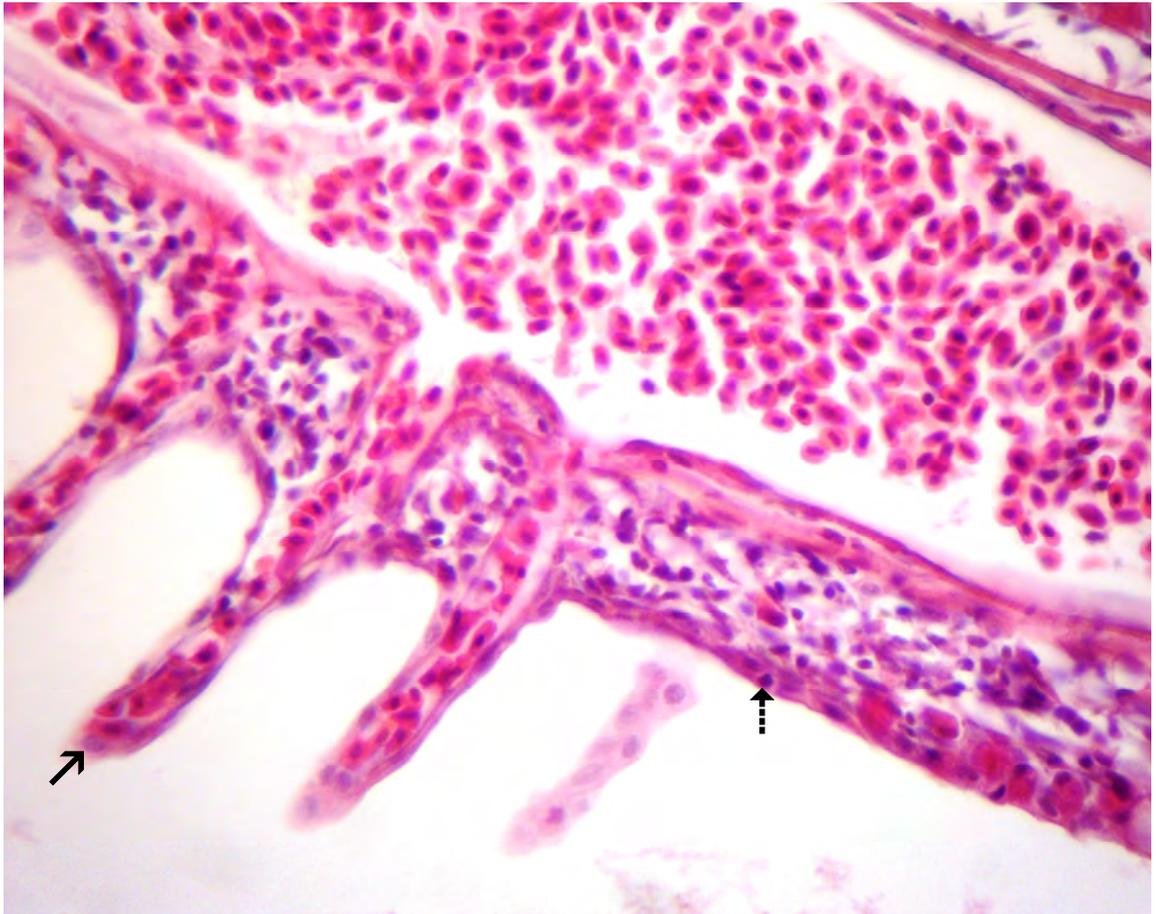


Figura 22. Células com citoplasma eosinofílico, homogêneo e núcleos necróticos (picnose “↑” e cariorexia “↗”). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

Foram analisadas 30 brânquias das espécies provenientes da baía de Paraty (18 *M. americanus* e 12 *M. furnieri*) e 28 da baía de Sepetiba (16 *M. americanus* e 12 *M. furnieri*) (Tabela 1). Após realizar a análise de todas as lâminas o valor de VMA foi calculado para cada animal pela fórmula: $VMA = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$. Valores de VMA entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 apontam dano leve ao órgão; valores entre 21 e 50 assinalam mudanças moderadas no órgão; valores entre 51 e 100 indicam lesões graves e valores acima de 100 apontam dano irreversível ao órgão (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

De acordo com o esperado, a análise de todas as brânquias analisadas da baía de Sepetiba mostrou IAH igual a 100, fato que indicou danos irreversíveis aos órgãos. Por outro lado, brânquias provenientes da baía de Paraty apresentaram valor médio de alteração (VMA) variando de 11 a 20 e indicaram dano leve ao órgão.

Ambas apresentaram alta incidência para diversas alterações histológicas nas brânquias das duas espécies estudadas, incluindo: deslocamento epitelial, edema intersticial, hiperplasia epitelial, infiltração leucocitária, hiperplasia epitelial, fusão lamelar, vasodilatação, congestão lamelar, aneurisma e necrose (Figura 23).

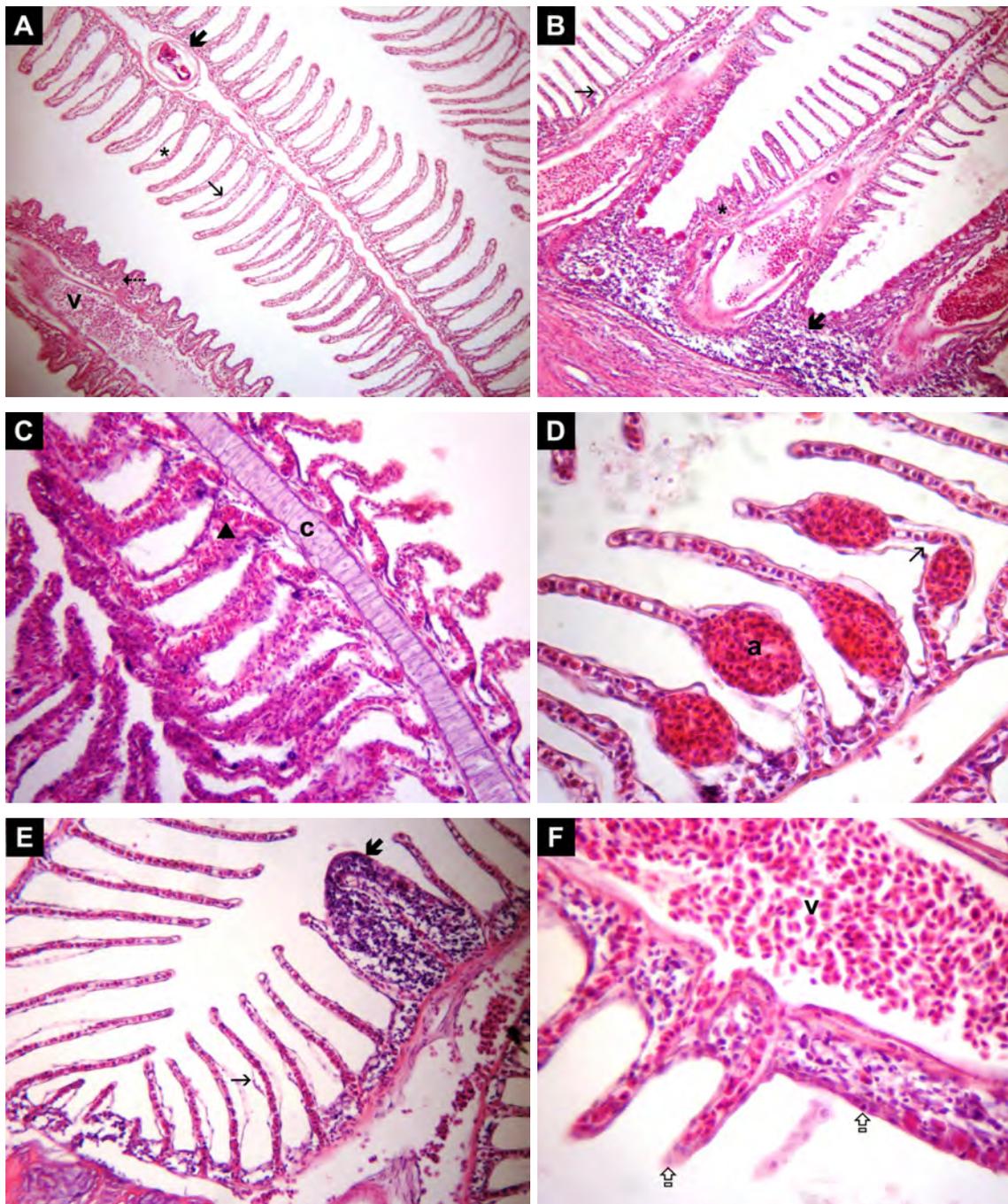


Figura 23. Fotomicrografias de brânquias das espécies estudadas, indicando a descrição das alterações histológicas. (A) Presença de áreas com deslocamento epitelial; edema intersticial (→); estrutura ovalada de coloração eosinofílica apresentando bordas delimitadas – parasito (↙); proliferação do epitélio de revestimento – hiperplasia do epitélio lamelar (⋯→) e vasodilatação (v) 300x. (B) Presença de células inflamatórias - infiltração leucocitária (↙); deslocamento epitelial (→); e perda de organização da

arquitetura da lamela - fusão lamelar (*) 300x. (C) Congestão lamelar (▲) e cartilagem elástica (c) 630x. (D) Dilatação lamelar é observada – aneurisma (a) e elevação epitelial (→) 1150x. (E) Elevação epitelial (→) e infiltração de leucócitos (⬛) 630x. (F) Presença de citoplasma eosinófilo, necrose (☞) e vasodilatação (v) Coloração: HE. Aumento 1310x.

A frequência das alterações histológicas (Tabela 3) indica que as alterações de estágio III são menos frequentes nas espécies coletadas na baía de Paraty, já as de estágio I e II são frequentes em ambos locais.

Tabela 3. Taxa de ocorrência de alterações histológicas encontradas nas brânquias de *M. americanus* e *M. furnieri* residentes nas baías de Paraty e Sepetiba.

Alterações histológicas	Baía de Paraty		Baía de Sepetiba	
	<i>M. americanus</i>	<i>M. furnieri</i>	<i>M. americanus</i>	<i>M. furnieri</i>
Deslocamento epitelial	41.7%* (5)	38.9%* (7)	91.7% (11)	100% (16)
Edema intersticial	58.3%* (7)	77.8% (14)	100% (12)	100% (16)
Infiltração leucocitária	83.3% (10)	88.9% (16)	100% (12)	100% (16)
Hiperplasia epitelial	58.3%* (7)	66.7%* (12)	91.7% (11)	100% (16)
Fusão lamelar	41.7%* (5)	38.9%* (7)	100% (12)	87.5% (14)
Vasodilatação	91.7% (11)	94.4% (17)	100% (12)	100% (16)
Congestão lamelar	83.3% (10)	94.4% (17)	100% (12)	100% (16)
Aneurisma	25%* (3)	33.3%* (6)	100% (12)	100% (16)
Necrose	16.7%* (2)	11.1%* (2)	100% (12)	93.8% (15)
Total	12	18	12	16

*P < 0.05 vs. grupo baía de Paraty x baía de Sepetiba.

Os resultados encontrados não mostraram diferenças significativas entre as alterações histológicas nas espécies.

Células mucosas

As células mucosas foram encontradas nos filamentos e lamelas em ambas espécies estudadas, e reagiram positivamente à coloração PAS e AB, indicando a presença de glicosaminoglicanas ácidas e neutras, respectivamente (Figura 24).

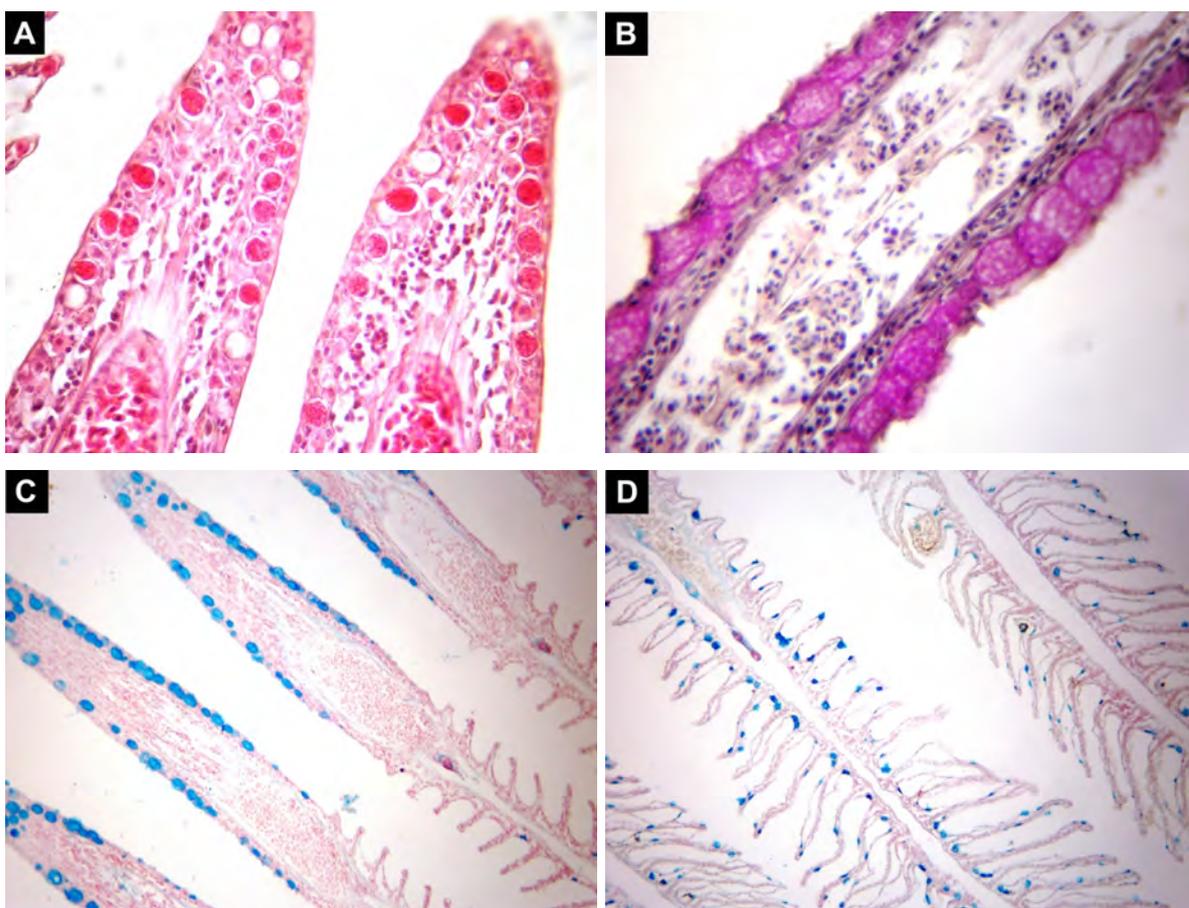


Figura 24. Histologia e histoquímica de brânquias: (A) Destaque de células mucosas. Coloração em HE. Aumento: 1150x. (B) Células coradas em magenta nas lamelas secundárias (reação positiva ao PAS) indicando a presença de glicoconjugados neutros. Aumento: 1150x. (C) Células de lamelas secundárias com reação positiva ao AB, indicando a presença de glicoconjugados. Aumento: 300x. (D) Distribuição uniforme das células mucosas ácidas na lamela branquial. Aumento: 150x.

A contagem de células positivas para células mucossecretoras neutras apresentou diferença estatística apenas nas células mucosas das brânquias coletadas da espécie *M.*

americanus, embora o gráfico abaixo (Figura 25) mostre que *M. furnieri* coletado na baía de Paraty apresentou menor quantidade de células mucosas. A contagem de células positivas para glicoconjugado ácido indicou diferença estatisticamente significativa em ambas as espécies na comparação entre os locais (nas baías de Paraty e Sepetiba); este resultado mostra que os animais que vivem na baía de Paraty têm menor número de células mucosas quando comparados aos que vivem na baía de Sepetiba (Figura 25).

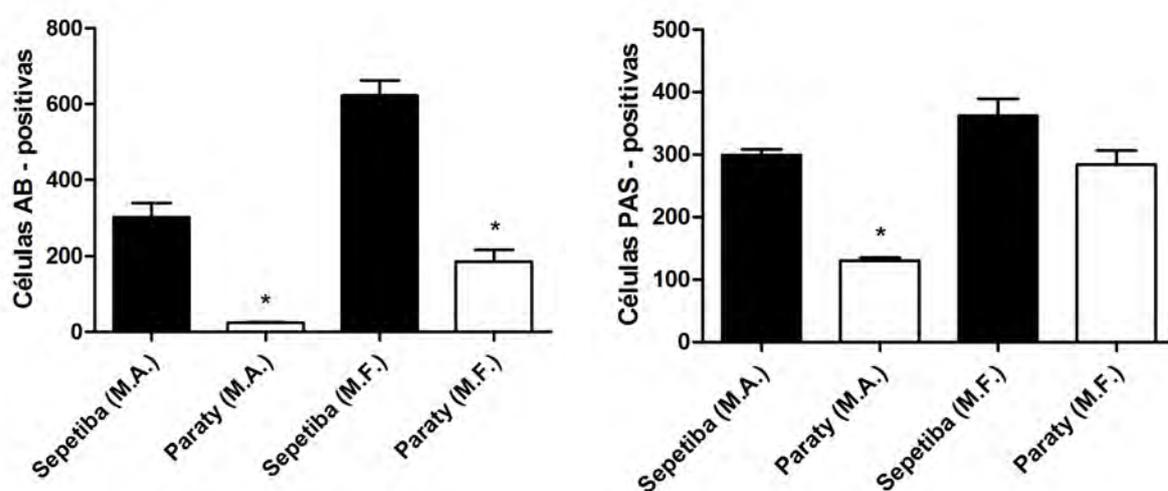


Figura 25. Efeitos do aumento da quantidade de secreção de mucos ácidos e neutros. A- Contagem das células positivas para secreção de mucos ácidos demonstrou aumento nos animais coletados na baía de Sepetiba quando comparados com a baía de Paraty em ambas espécies. B- A quantidade de células positivas para secreção de mucos neutros foi maior na baía de Sepetiba na espécie *M. americanus*, enquanto na espécie *M. furnieri* indicou um aumento na baía de Sepetiba, porém sem diferença estatística. Dados (n = 10 por grupo) são expressos como média ± DP. *P < 0.05 vs. grupo baía de Paraty x baía de Sepetiba.

8.3 Infecções Parasitárias

As infecções parasitárias em peixes são extremamente comuns em populações de peixes selvagens, e em condições normais os hospedeiros apresentam pouco ou nenhum sinal de infecção (FEIST, 2009). A histologia se mostra importante para análise das infecções por parasitas que podem ocorrer nas brânquias. Apesar da ocorrência de ectoparasitas e endoparasitas serem comuns em brânquias de peixes, dependendo da incidência podem ser considerados um potente biomarcador (RIBEIRO; KATSUMITI; FRANÇA; MASCHIO *et al.*, 2013). Assim sendo, os parasitas podem atuar como um parâmetro para a verificação do estado de saúde de organismos aquáticos (RIBEIRO; KATSUMITI; FRANÇA; MASCHIO *et al.*, 2013). No presente estudo ectoparasitas (não identificados) foram observados nas brânquias das duas espécies estudadas (Figura 25), e em ambos locais de coleta.

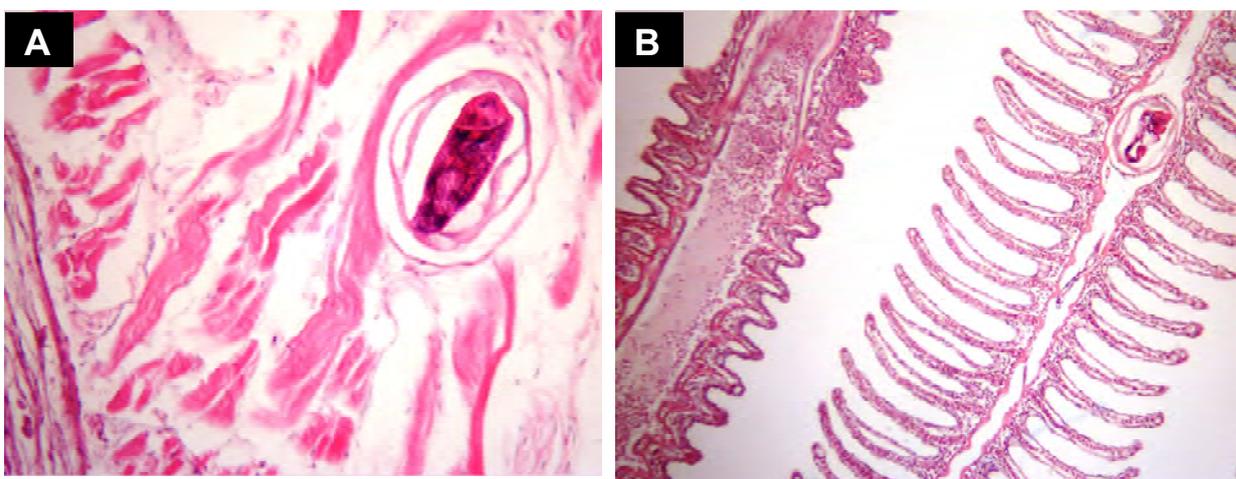


Figura 26. Cortes histológicos de brânquias de peixes infectados por parasitas. (A) Parasita na camada muscular da brânquia. (B) Parasita na lamela branquial. Coloração: HE. Aumentos: 1150x e 300x.

8.4 Discussão

Alterações como edema intersticial e infiltrações leucocitárias são frequentemente encontradas em casos de distúrbios ecológicos, como marés vermelhas; bem como em animais expostos a poluentes químicos, como metais pesados e certos pesticidas, e a doses de formalina terapêutica ou peróxido de hidrogênio (SKIDMORE; TOVELL, 1972; YANG; ALBRIGHT, 1992). Essas alterações refletem distúrbios na regulação da pressão osmótica (STRZYŻEWSKA; SZAREK; BABINSKA, 2016). No total, 100% dos peixes coletados na baía de Sepetiba apresentaram as duas alterações avaliadas. As amostras de *M. americanus* coletadas na baía de Paraty apresentaram 58,3% de edema intersticial e 83,3% de infiltração de leucócitos, enquanto *M. furnieri* apresentou 77,8% de edema intersticial e 88,9% de infiltração de leucócitos.

A hiperplasia lamelar é frequentemente associada a respostas em longo prazo de animais expostos a altas concentrações de sulfato de cobre (WANI; SIKDAR-BAR; BORANA; KHAN *et al.*, 2011). Este processo resulta da exposição crônica dos animais a poluentes de origem hídrica, tais como amônia e microrganismos (KARGES; WOODWARD, 1984). Essa mudança ocorre quando as células das lamelas primárias migram distalmente, o que resulta no acúmulo de células na borda anterior da lamela secundária (ROGERS, 2007). O acúmulo de células pode levar ao aumento do número de células mucosas na base das lamelas; conseqüentemente, a área respiratória é significativamente reduzida. Esse resultado é amplamente relatado como o efeito histopatológico de substâncias tóxicas, como óleos crus e de seus subprodutos (GUSMÃO; RODRIGUES; MOREIRA; ROMANO *et al.*, 2012; MOVAHEDINIA; BEHROOZ; MAHMOOD, 2012). Essa alteração foi encontrada em menor freqüência nos animais coletados na baía de Paraty.

A fusão lamelar é uma resposta considerada protetiva, pois reduz à área vulnerável da brânquia, esta resposta retarda a entrada de substâncias tóxicas nas brânquias (MALLATT, 1985). A fusão lamelar secundária pode ocorrer devido à hiperplasia lamelar grave; assim, pode levar a fusão parcial ou total de capilares lamelares dentro de uma massa de epitélio hiperplásico. No entanto, o nível de proliferação de células epiteliais é frequentemente menor do que o de alterações hiperplásicas causadas por modificações na consistência do muco. Essas alterações foram associadas a efeitos crônicos causados pelo alumínio, como descrito em trutas marrons (KARLSSON-NORRGREN; BJORKLUND; LJUNGBERG; RUNN, 1986). A fusão lamelar

secundária, hiperplasia lamelar grave e hiperplasia do epitélio lamelar representam as adaptações que ocorrem em maior abundância em resposta à baixa qualidade da água, estas alterações visam diminuir a superfície respiratória e aumentar a distância de difusão (SOLLID; NILSSON, 2006), porém como efeito colateral pode sufocar o peixe (MALLATT, 1985). A fusão lamelar foi a alteração encontrada com menor frequência nos animais coletados na baía de Paraty.

O deslocamento epitelial é uma das primeiras alterações histológicas observada em brânquias expostas a substâncias tóxicas, como óleos, detergentes, amônia, fenol e ácidos, bem como a metais (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994). A separação e o desprendimento do epitélio da lamela secundária aumenta os espaços intracelular entre o sistema pilar e o revestimento epitelial (ELSHAER; M ELSHAER; ALLAH; BAKRY, 2015). Esta alteração pode atuar como uma medida de proteção, aumentando a distância de difusão entre o poluente e sangue, evitando a entrada de xenobióticos no organismo e comprometendo o consumo de oxigênio (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008). Essas alterações são típicas de uma resposta inflamatória aguda. Com base nos resultados do presente estudo, essa alteração foi encontrada em 41,7% da *M. americanus* e em 38,9% da *M. furnieri* da baía de Paraty, assim como em 91,7% da *M. americanus* e em 100,0% da *M. furnieri* na baía de Sepetiba.

As espécies de peixes coletadas na baía de Sepetiba apresentaram 100% de vasodilatação, enquanto *M. americanus* e *M. furnieri* coletadas na baía de Paraty registraram, respectivamente, 91,7% e 94,4% de vasodilatação. Essa mudança indica exposição severa de animais aquáticos a poluentes presentes na água (GOMES; NASCIMENTO; SALES; ARAÚJO, 2012). Peixes submetidos a condições estressantes podem apresentar alterações vasculares nas lamelas - sua resposta a essa exposição pode ser disfuncional e prejudicar sua fisiologia (HEATH, 1995; LIMA; RIBEIRO; MELO, 2006).

A congestão sanguínea lamelar foi encontrada em todas as espécies (100%) coletadas na baía de Sepetiba, e na maioria das espécies coletadas na baía de Paraty. Essa mudança pode causar danos microscópicos e perda das células pilares, isto prejudica a função de troca gasosa das brânquias; levando à perda da capacidade de suporte e, conseqüentemente, desordem estrutural lamelar (STRZYŻEWSKA; SZAREK; BABINSKA, 2016).

O aneurisma é caracterizado por extravasamento de sangue dentro das lamelas e pela ruptura do sistema de células pilares, com subsequente dilatação dos vasos sanguíneos (MARTINEZ; NAGAE; ZAIA; ZAIA, 2004). Esta alteração representa o efeito deletério dos

xenobióticos no tecido branquial (SIMONATO; GUEDES; MARTINEZ, 2008); além disto é considerada uma mudança severa e muitas vezes irreversível. Essa alteração foi encontrada em 100% dos peixes coletados na baía de Sepetiba, enquanto os peixes coletados na baía de Paraty registraram baixa taxa de aneurisma. A incidência de aneurismas nas espécies aqui selecionadas pode estar associada aos seus hábitos alimentares, uma vez que a matéria orgânica encontrada no sedimento acumulou poluentes (STEHR; JOHNSON; MYERS, 1998). Aneurismas também foram observados nas brânquias de peixes expostos ao cádmio, que é um metal pesado frequentemente usado em estudos toxicológicos experimentais. Essa mudança resulta do acúmulo significativo de cádmio no ambiente e nos resíduos industriais e domésticos (GARCIA SANTOS; MONTEIRO; ROCHA; FONTAÍNHAS-FERNANDES, 2007).

A necrose pode ser caracterizada por citoplasma eosinofílico e núcleos de caráter necrótico (picnose, carorrexia e cariólise); esses fenômenos são típicos de processos degenerativos. A necrose das células epiteliais branquiais é frequentemente observada após a exposição dos animais a toxinas (ROGERS, 2007). A necrose pode ser vista como resultado da exposição prolongada a irritantes que incluem suspensões encontradas na água, que podem ser causadas pela turbidez (STRZYŻEWSKA; SZAREK; BABINSKA, 2016). Essa mudança histológica irreversível foi encontrada em quase todos os animais coletados na baía de Sepetiba, enquanto os coletados na baía de Paraty apresentaram baixa frequência.

Análise de Células Mucosas

Estudos disponíveis na literatura têm destacado o importante papel desempenhado pelas células mucosas nas brânquias de peixe (SABOIA-MORAES; HERNANDEZ-BLAZQUEZ; MOTA; BITTENCOURT, 2005). Em termos fisiológicos, a secreção de muco está principalmente associada à lubrificação do trato respiratório e à proteção contra microrganismos patogênicos (ZACCONE; SALVATORE; AINIS; CONTINI, 1989; WHITEAR; MITTAL, 2006). Essa secreção também desempenha um papel importante na regulação e difusão de íons em peixes, proteção contra choques mecânicos da matéria suspensa na água e exposição a poluentes dissolvidos na água (HANDY; EDDY; ROMAIN, 1989; MORON; ANDRADE; FERNANDES, 2009). Glicoconjugados secretados na superfície das células mucosas

desempenham um papel importante na lubrificação, bem como na proteção contra e inibição de microorganismos (DÍAZ; M GARCÍA; DEVINCENTI; GOLDEMBERG, 2001). Os peixes coletados na baía de Paraty apresentaram número menor de células mucosas que os da baía de Sepetiba. A hipersecreção de muco branquial corresponde a uma resposta não específica, relatada para peixes em condições ácidas (KARLSSON-NORRGREN; BJORKLUND; LJUNGBERG; RUNN, 1986; MC CAHON; PASCOE; MC KAVANAGH, 1987; H. JAGOE; A. HAINES, 1997), bem como para peixes expostos a poluentes de diversas naturezas (MALLATT, 1985). Além disso o aumento da secreção de muco pode estar relacionado a maior turbidez encontrada na baía de Sepetiba.

8.5 Conclusão

Alterações histológicas e células produtoras de muco foram observadas em maior quantidade nas brânquias de peixes coletados na baía de Sepetiba, esse resultado evidencia resposta à contaminação por xenobióticos inespecíficos encontrados nos locais avaliados. As alterações histológicas observadas no epitélio branquial de *M. americanus* e *M. furnieri* podem diferenciar claramente a baía de Paraty (área de referência) da baía de Sepetiba (poluída). A maior ocorrência de lesões branquiais graves mostra que os peixes da baía de Sepetiba estão enfrentando estresse devido aos poluentes da água. Portanto, alterações histológicas são biomarcadores úteis para medir a contaminação ambiental nas baías de Paraty e Sepetiba.

CAPÍTULO II

Alterações histológicas renais analisadas em peixes e sua utilização como biomarcadores dos impactos ambientais nas baías de Paraty e Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

Biomarcadores histológicos são utilizados para avaliar as condições de saúde de diferentes organismos e para indicar sinais de alerta de risco ambiental. A histologia pode ser aplicada como um método eficaz para analisar os efeitos de poluentes e outros estressores. Neste sentido, este estudo relata a incidência de alterações histológicas encontradas nos rins das espécies de peixes marinhos *Menticirrhus americanus* (LINNAEUS, 1758) e *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823), que foram coletados na baía de Sepetiba (poluída) e na baía de Paraty (área de referência) como bioindicador para medir a qualidade ambiental. No total, 58 peixes foram coletados, e foram realizadas análises histológicas nos mesmos. As alterações histológicas observadas nos rins dos peixes coletados na baía de Sepetiba contrastam com os coletados na baía de Paraty, no que diz respeito ao tipo e gravidade de lesões observadas. As alterações histológicas de estágio I e II foram encontradas em quase todos os peixes que foram analisados de ambas as baías, porém a necrose teve uma frequência maior nos animais da baía de Sepetiba, sendo estas consideradas lesões irreversíveis. Com base nos resultados, a alta incidência de alterações de estágio III (lesões graves) nos rins de *M. americanus* e *M. furnieri* nos peixes da baía de Sepetiba é uma evidência da má qualidade ambiental. Assim sendo, foi possível concluir que os biomarcadores histológicos podem ser utilizados como bioindicadores gerais de qualidade do ambiente aquático.

Palavras-chave: morfologia; estuário; Sciaenidae; rim.

ABSTRACT

Histological biomarkers are used to assess the health conditions of different organisms and to indicate warning signs of environmental risk. Histology can be applied as an effective method for analyzing the effects of pollutants and other stressors. In this sense, this study reports the incidence of histological changes found in the kidneys of the marine fish species *Menticirrhus americanus* (LINNAEUS, 1758) and *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823), which were collected from Sepetiba Bay (polluted site) and Paraty (reference area) as a bioindicator for measuring environmental quality. In total, 58 fish were collected from the above mentioned bays, and histological analyzes were performed on them. The histological changes observed in the kidneys of fish collected in Sepetiba bay contrast with those collected in Paraty bay, regarding the type and severity of lesions observed. Stage I and II histological alterations were found in almost all fish analyzed from both Bays, but necrosis was more frequent in Sepetiba Bay animals, which were considered irreversible lesions. Based on the results, the high incidence of stage III changes in the kidneys of *M. americanus* and *M. furnieri* in Sepetiba Bay fish is evidence of poor environmental quality. Thus, it was possible to conclude that histological biomarkers can be used as general bioindicators of aquatic environment quality.

Keywords: morphology; estuary; Sciaenidae; kidney.

9.1 Objetivos Específicos

- Descrever o padrão histomorfológico dos rins dos peixes *M. americanus* e *M. furnieri*.
- Analisar e classificar as possíveis alterações histológicas para avaliar o uso deste, nas espécies analisadas, como biomarcador histológicas da exposição prévia a estressores ambientais.
- Comparar os resultados obtidos nas análises histológicas dos rins destas duas espécies de ceniídeos, visando gerar dados relacionados à resposta biológica ocorrida após possível exposição de misturas de xenobióticos nestes diferentes ecossistemas marinhos localizados no Rio de Janeiro.

9.2 Resultados

Análise histológica

Observou-se que as espécies estudadas apresentam padrão histomorfológico semelhantes (Figura 27).

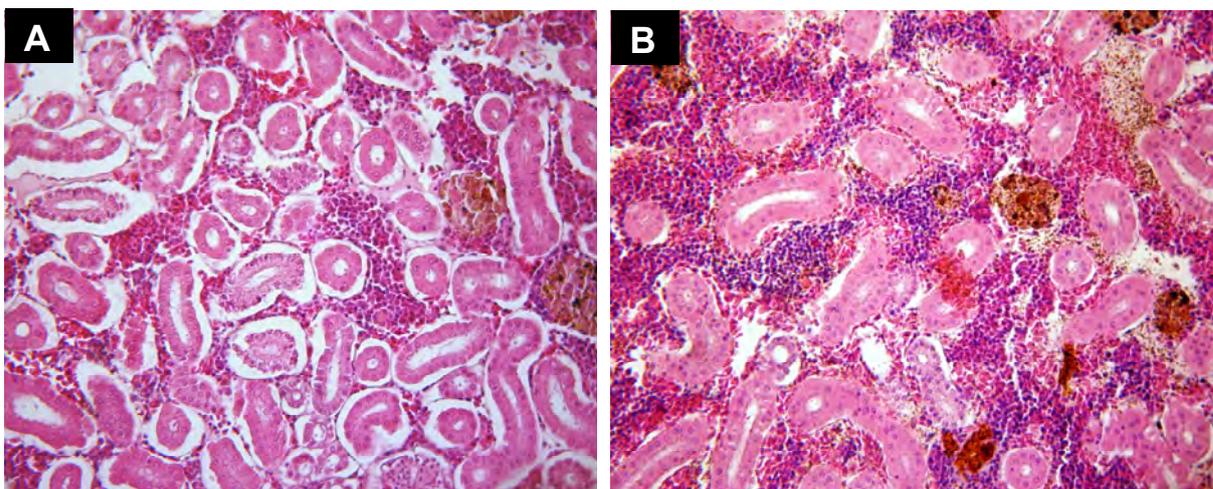


Figura 27. Presença de túbulos renais, tecido hematopoiético e centros melanocrofágicos. (A) *M. furnieri*. (B) *M. americanus*. Coloração: HE. Aumentos: 150x.

Os rins das espécies aqui estudadas são divididos em região anterior e posterior, para a execução do estudo foi realizada a coleta da região posterior do rim. As unidades funcionais do rim posterior são os néfrons, cuja função é filtrar o sangue, reter e reabsorver água, hormônios, nutrientes e excretar outras substâncias no lúmen renal. O néfron é formado por quatro regiões distintas: glomérulo, tubo proximal e túbulo coletor (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; FEIST, 2009). Os túbulos proximais estão cobertos com uma cobertura de glicocálice (borda em escova), os túbulos distais não apresentam bordas em escova, e os túbulos coletores consistem em epitélios colunares com núcleos basais sem borda em escova (Figura 28). Apesar de fazer parte do sistema excretor, ele é composto por tecido hematopoiético. Por ser o principal local de hematopoiese no peixe, o tecido hematopoiético forma uma matriz de suporte para os néfrons do

rim posterior, outra estrutura celular, encontrada em todos teleósteos é o centro dos melanomacrofágicos.

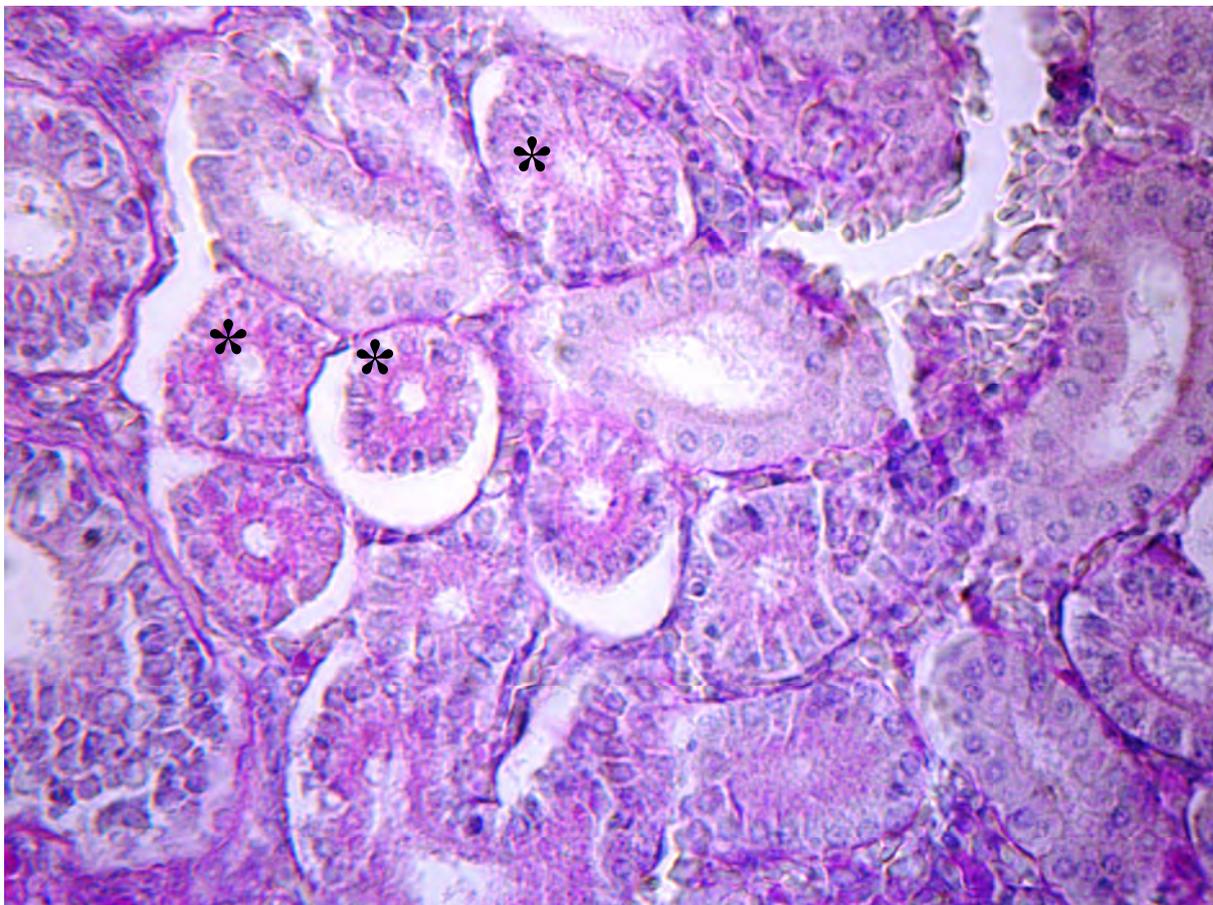


Figura 28. Túbulos proximais, revelando a presença de abundante glicocálice associado aos microvilos (“borda em escova”) em sua região apical (*). Coloração: PAS. Aumento: 1150x.

Microscopia Eletrônica Transmissão

A existência de células mesangiais com prolongamentos citoplasmáticos e de células mesangiais com aparência dendrítica sugere um papel funcional complexo (contrátil e fagocítica) para o mesângio (OJEDA; ICARDO; WONG; IP, 2006). Observamos que células mesangiais apresentam corpos celulares alongados, que estão incorporados nos componentes da membrana basal - CMB (Figura 29 A, B). Estas células formam um obstáculo à passagem das macromoléculas por meio de uma barreira de filtração, podendo ser modificada por contração ou

expansão dos processos mesangiais (KREISBERG; KARNOVSKY, 1983). A membrana basal da cápsula de Bowman apresenta algumas fibras colágenas (Figura 29 B) paralelas a lâmina densa.

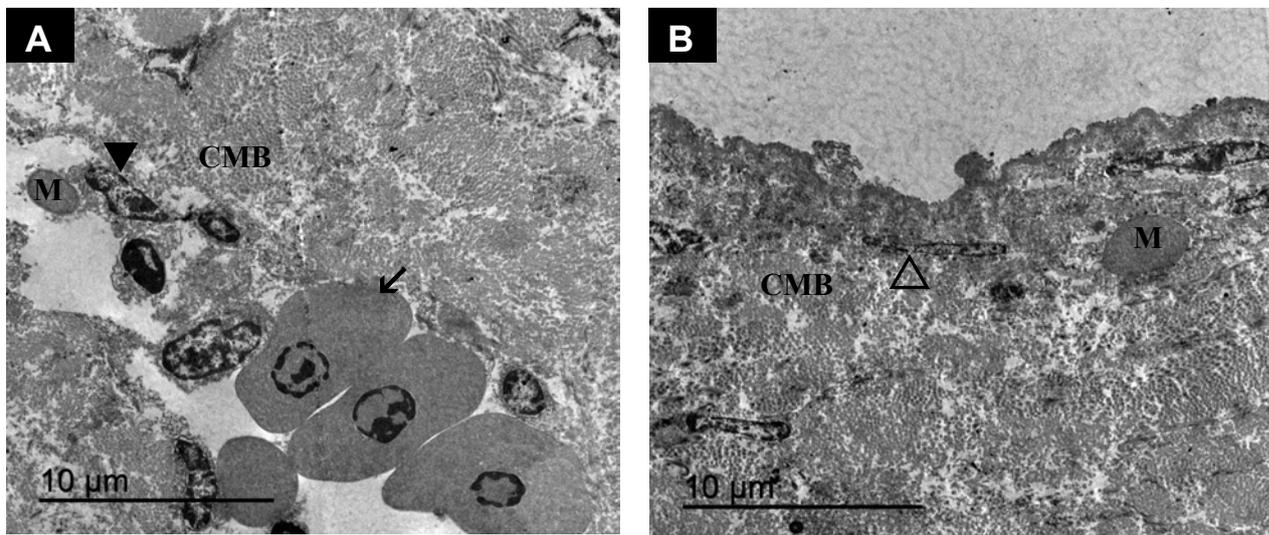


Figura 29. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão mostrando uma seção tangencial de um capilar glomerular. (A) Célula mesangial (▼) com um prolongamento citoplasmático incorporada nos componentes da membrana basal (CMB). Processo celular mesangial (M). Células colunares (↙). (B) Componentes da membrana basal (CMB). Processos celulares mesangiais (M). Fibras colágenas (△).

Alterações histológicas

As alterações histológicas encontradas nos rins dos peixes foram classificadas de acordo com as alterações propostas por (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011). Estes autores relatam que ocorre a divisão em três diferentes estágios, de modo que as alterações são agrupadas de acordo com os níveis modificação da arquitetura tecidual. Assim pode ser observado: **estágio I: Corpúsculo** - dilatação dos capilares glomerulares e hipertrofia glomerular; **Túbulos** – hipertrofia nuclear, hipertrofia celular, vacuolização citoplasmática, dilatação do lúmen do túbulo, regeneração tubular, centros melanomacrofágicos; **estágio II:** aumento do espaço de Bowman, congestão sanguínea na cápsula de Bowman, degeneração tubular e aumento do calibre do lúmen tubular; **estágio III:** necrose.

- **Hipertrofia glomerular e dilatação capilar do glomérulo:** A hipertrofia celular resulta da alteração no tamanho e/ou na proporção do número de núcleos dos glomérulos (Figura 30). Já o processo de dilatação do glomérulo está relacionado, com a manutenção e regulação da homeostase do sistema circulatório. Este tipo de alteração afeta a taxa de filtração glomerular e indica que estas resultam de mecanismos reguladores extrínsecos e intrínsecos, os quais são necessários para garantir que a taxa de filtração glomerular seja suficiente para permitir que os rins eliminem produtos da decomposição metabólica e regula a pressão arterial, sem causar perda excessiva de água.

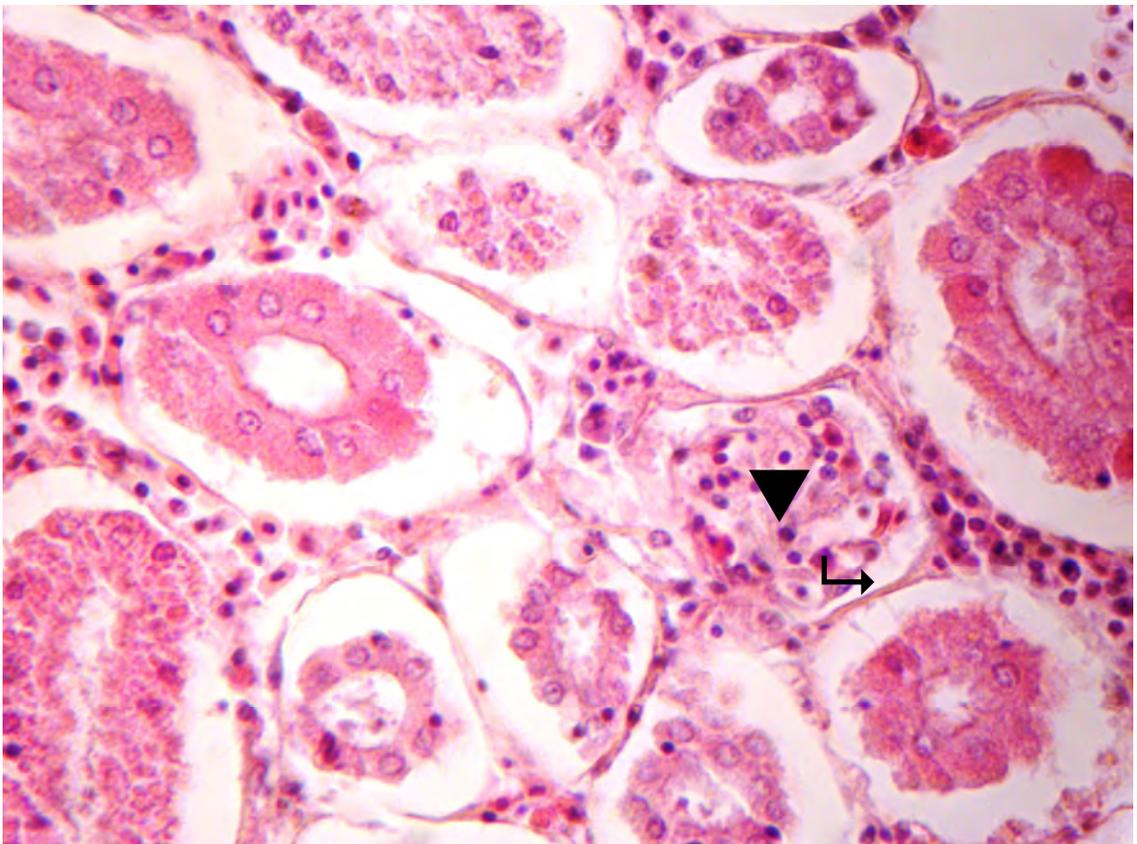


Figura 30. Alteração histológica no corpúsculo renal, o triângulo (▼) mostra o processo de hipertrofia glomerular, já a seta (↪) indica o processo de dilatação capilar do glomérulo. Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Hipertrofia nuclear e celular:** Há uma alteração no tamanho e/ou na proporção do número de núcleos dos túbulos contorcidos (Figura 31). Este aspecto pode ser observado por meio da comparação com núcleos de células normais do mesmo tipo e pela razão do tamanho do núcleo em relação ao tamanho da célula inteira.

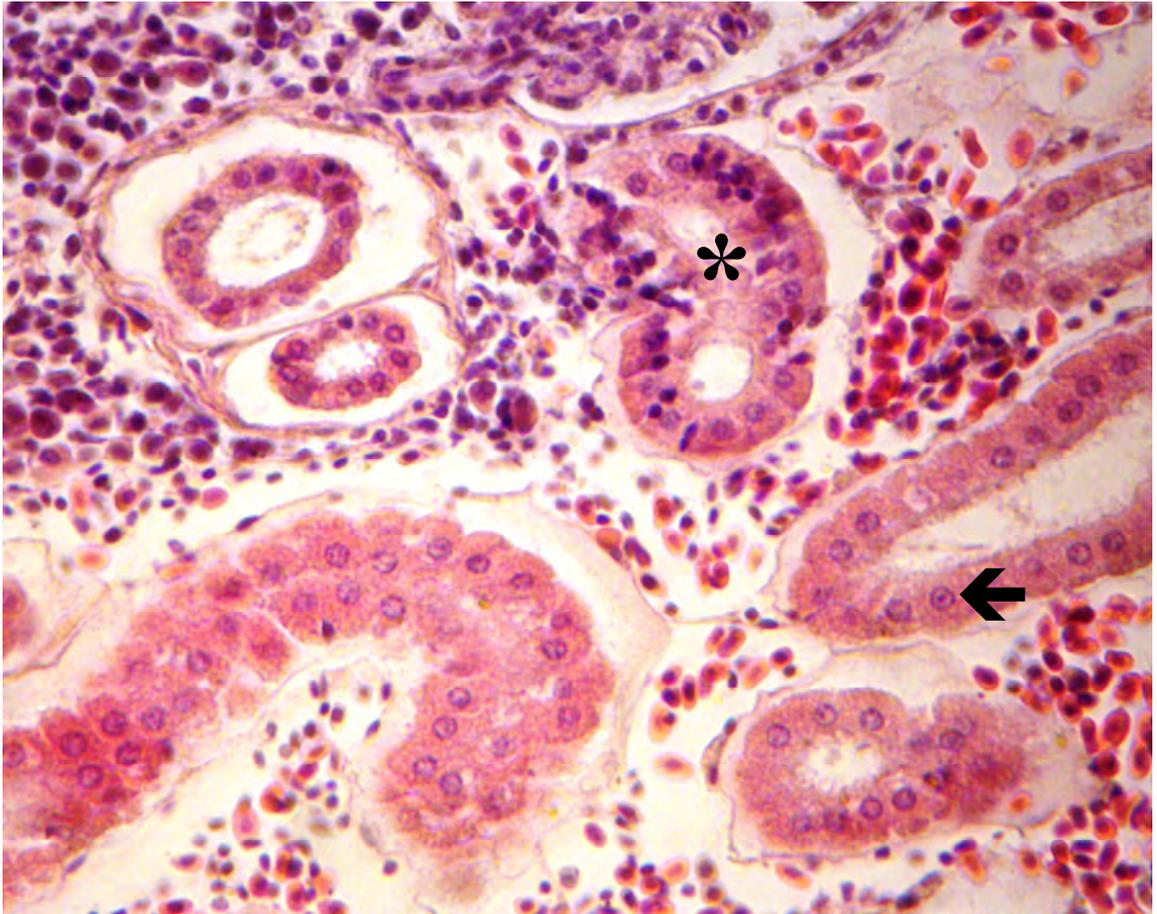


Figura 31. Células com alteração no tamanho asterisco (*) indicam a hipertrofia nuclear, já a seta (↖) aponta a hipertrofia celular. Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Vacuolização citoplasmática:** Alteração evidenciada pela presença de formações circulares de coloração negativa localizada no citoplasma celular (Figura 32). Podendo indicar a possibilidade de diagnósticos diferenciais como degeneração gordurosa ou hidrópica.

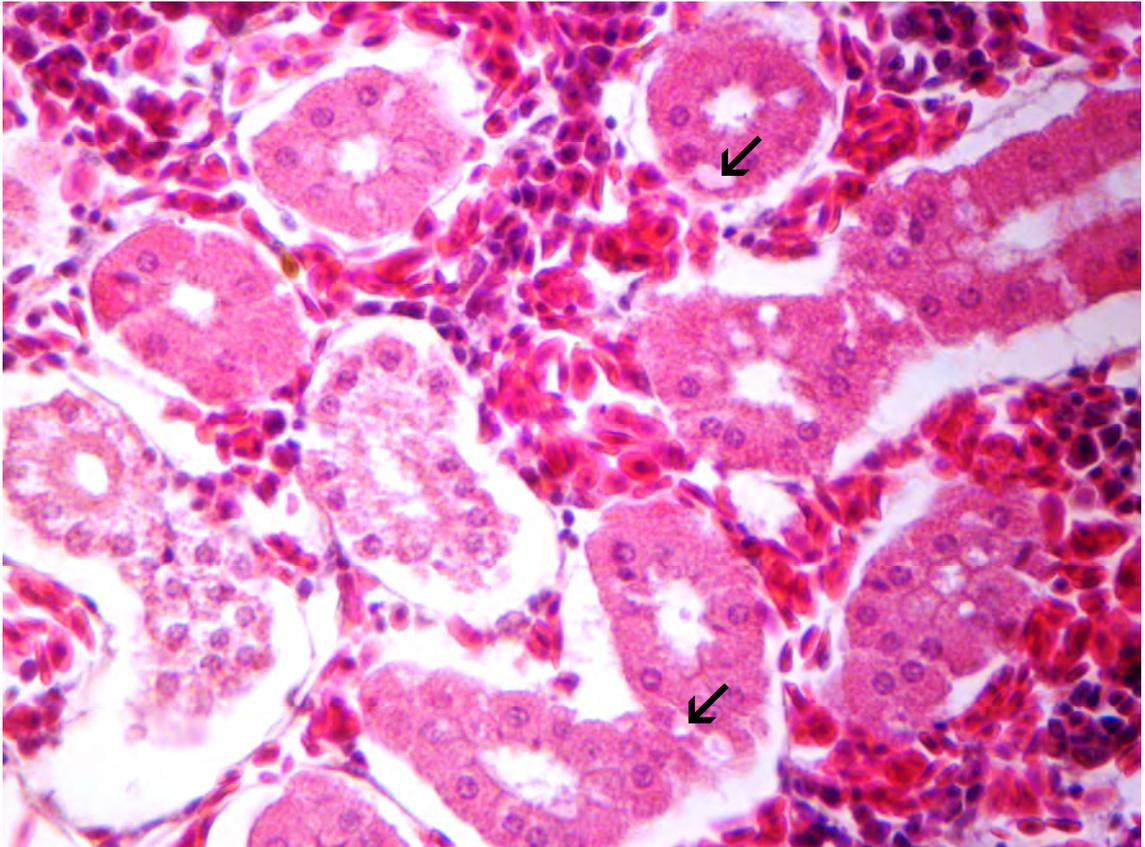


Figura 32. Células com ausência de coloração são indicadas por setas (↙). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Dilatação do lúmen do túbulo e aumento do calibre do lúmen tubular:** Nesse tipo de alteração, observa-se a presença de túbulos com diâmetros levemente mais amplos (Figura 33). Já na dilatação do lúmen do túbulo, observa-se o aumento da luz tubular.

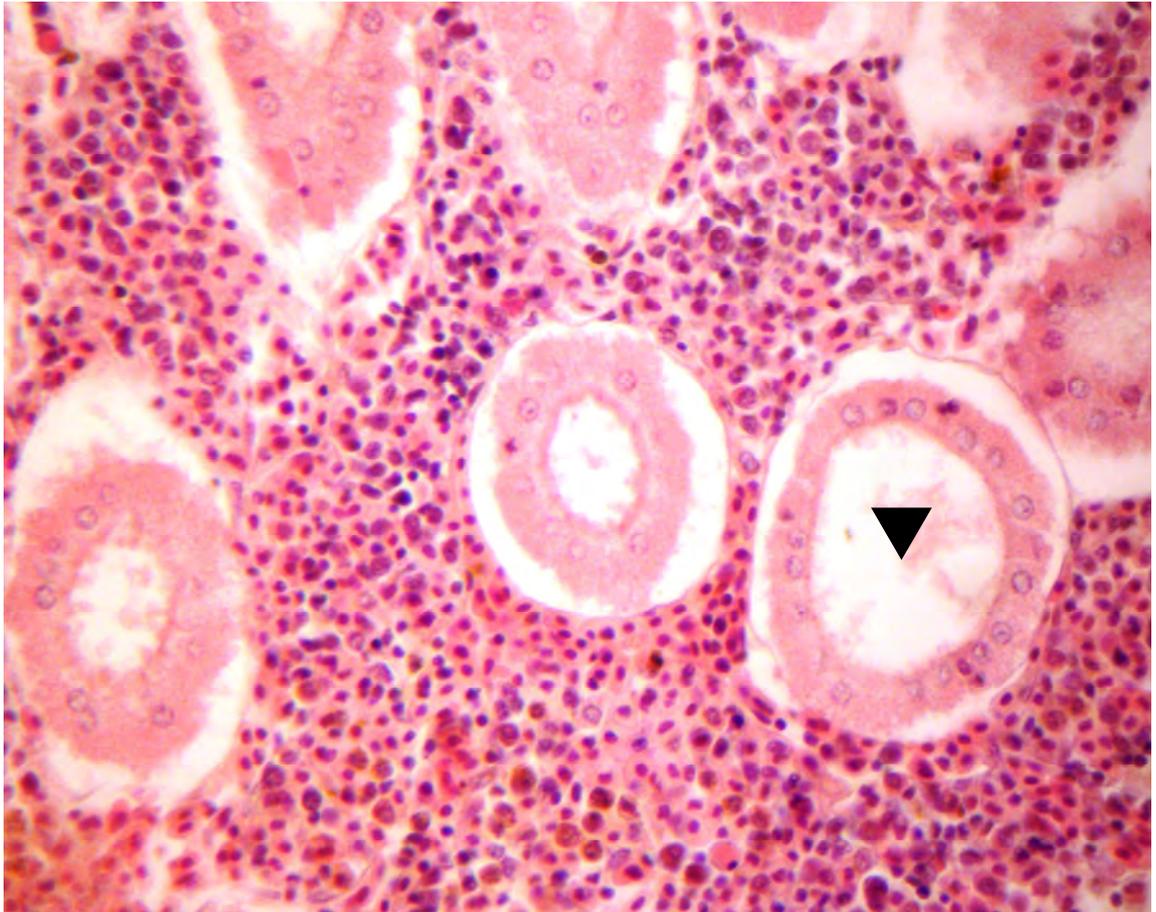


Figura 33. Rim com túbulos proximais com alteração no diâmetro do lúmen (▼).
Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Centros melanomacrofágicos:** As células são encontradas apresentando grânulos difusos pelo citoplasma de formato arredondado, que se diferenciam dos heterófilos por serem granulações menores, no citoplasma celular (Figura 34). Estes agregados podem indicar uma resposta fisiológica do sistema imunológico.

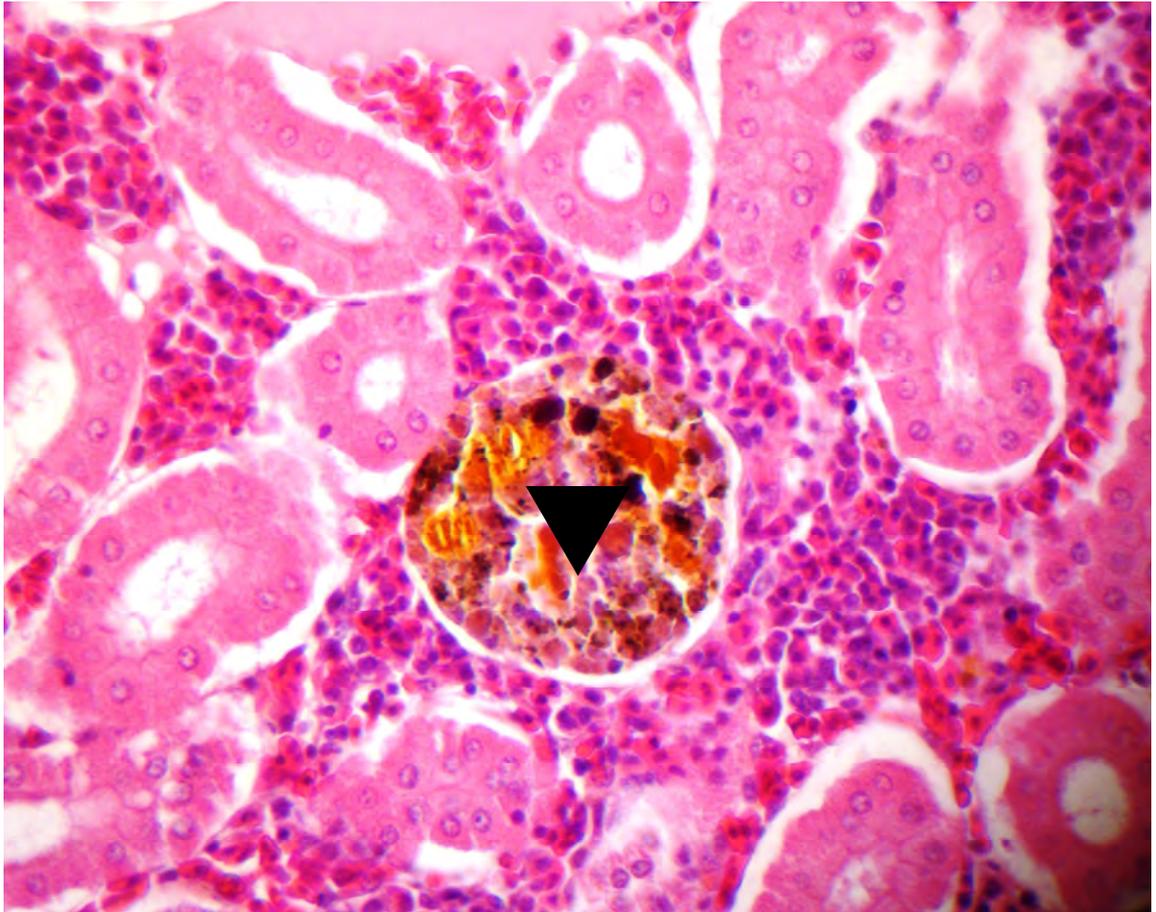


Figura 34. Reunião de estruturas esféricas basofílicas entremeadas ao parênquima, assim como a presença de pigmento acastanhado granular (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Degeneração tubular:** Pode ocorrer no epitélio dos túbulos proximal e distal, a célula epitelial sofre hipertrofia, o citoplasma exibe pequenos grânulos, o contorno celular não pode ser claramente distinguido e o calibre luminal do túbulo diminui (Figura 35).

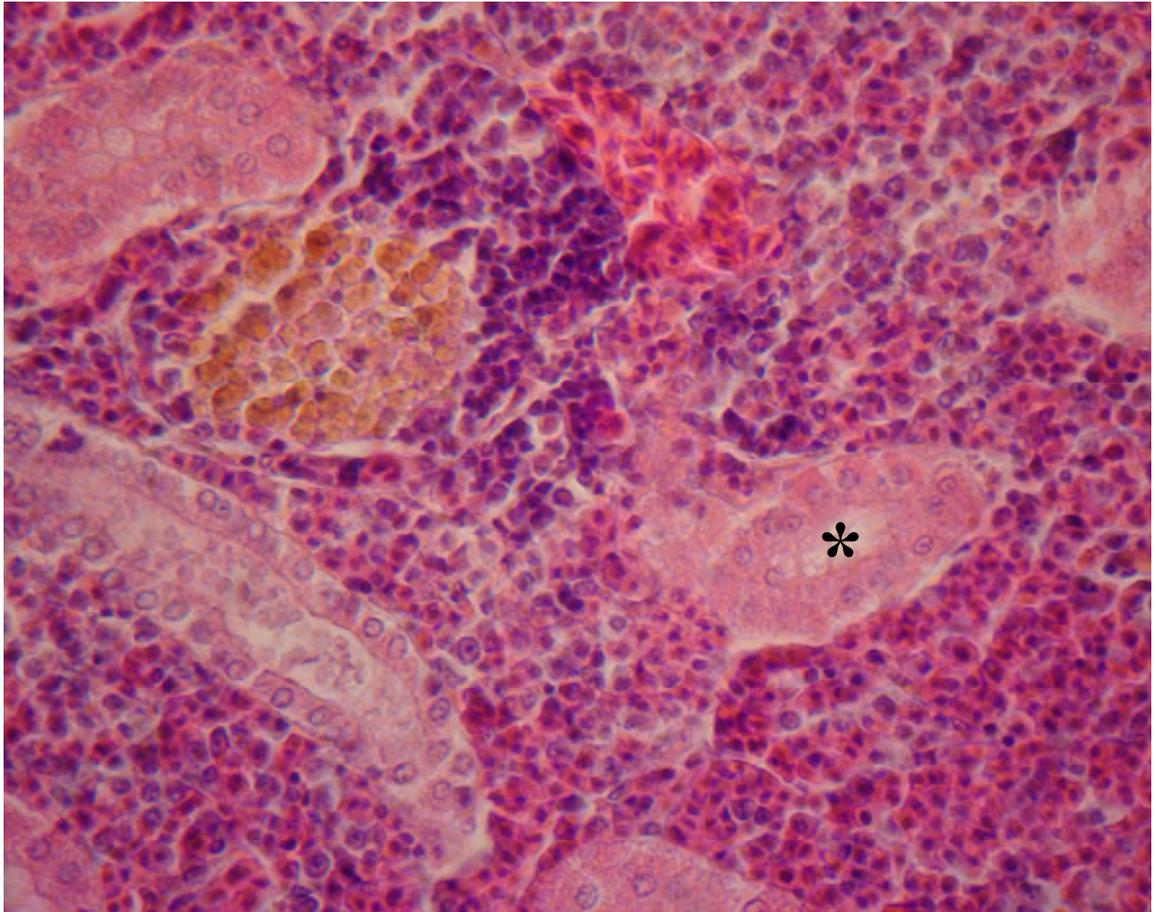


Figura 35. Túbulos compostos por células cúbicas, no qual o contorno celular não se encontra bem definido (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Regeneração tubular:** Há presença de aglomerados de células proliferadas, chamada hiperplasia celular (Figura 36). Esse tipo de alteração indica uma tentativa de reparação do tecido lesionado com a finalidade de se reestabelecer a homeostasia do sistema em questão.

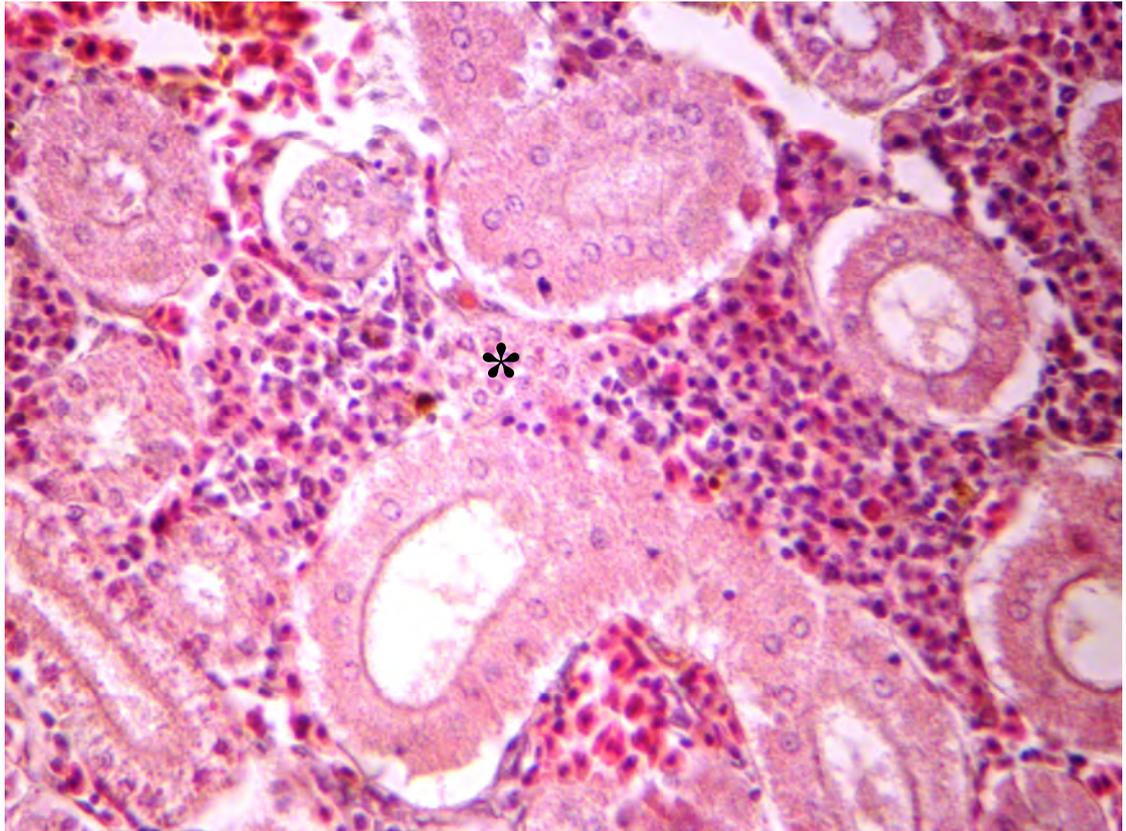


Figura 36. Parênquima renal apresentando, aglomerado de núcleos e aumento de mitoses indicando a tentativa de regeneração tubular (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Aumento do espaço de Bowman e congestão sanguínea na cápsula de Bowman:** O aumento da cápsula de Bowman ocorre secundariamente à obstrução dos túbulos. Ao se observar o parênquima, observamos néfrons apresentando uma maior distância entre a cápsula de Bowman e os capilares glomerulares (Figura 37), o que pode interferir na velocidade de filtração do néfron ou ser resultante de uma alteração prévia. A congestão sanguínea (Figura 37) é consequência do excesso de glóbulos vermelhos nos capilares que pode causar sua ruptura e, nesse caso, é comum encontrar os glóbulos vermelhos no espaço de Bowman.

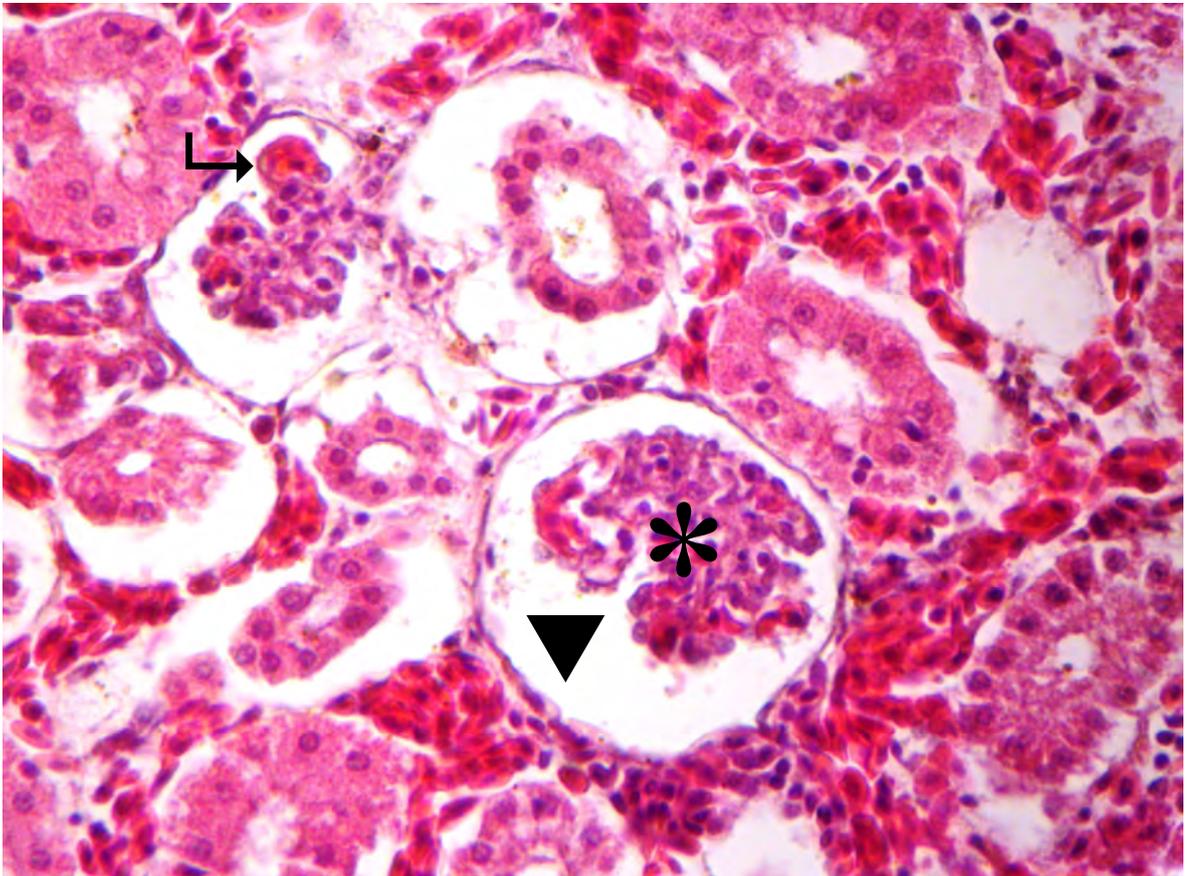


Figura 37. Na cápsula de Bowman observamos excesso de hemácias na rede de capilares (↪), além do aumento do espaço da cápsula (▼), e glomérulos dilatados (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Necrose:** A necrose é marcada com graves alterações no núcleo celular. O citoplasma sofre alterações apresentando citoplasma intensamente eosinofílico (Figura 38). Dessa forma, o diagnóstico da necrose depende de características específicas observadas na área estudada.

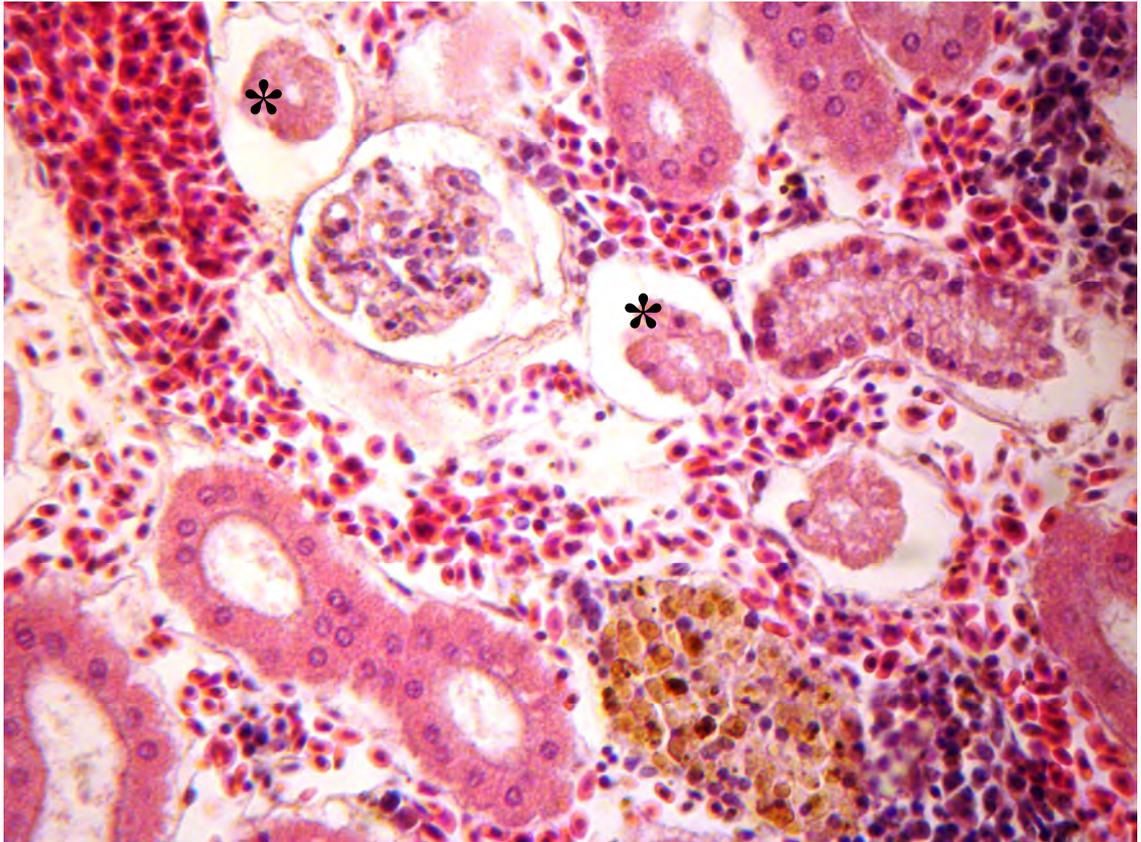


Figura 38. Parênquima renal com presença de túbulos compostos por células cúbicas de citoplasma tumefeito, claro, e núcleo de aspecto necrótico, ou ausência de núcleo (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

Foram analisados 21 rins das espécies provenientes da baía de Paraty (10 *M. americanus* e 11 *M. furnieri*) e 19 da baía de Sepetiba (9 *M. americanus* e 10 *M. furnieri*) (Tabela 1). Após realizar a análise de todas as lâminas o valor de VMA foi calculado para cada animal pela fórmula: $VMA = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$ (SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997). Valores de VMA entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 apontam dano leve ao órgão; valores entre 21 e 50 assinalam mudanças moderadas no órgão; valores entre 51 e 100 indicam lesões graves e valores acima de 100 apontam dano irreversível ao órgão (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Os resultados encontrados não apresentaram diferenças significativas entre as espécies. De acordo com o esperado, todos os rins analisados da baía de Sepetiba apresentaram um VMA acima de 100, indicando dano irreversível ao órgão. Enquanto os rins analisados na baía de Paraty apresentaram os valores de VMA entre 21 e 50, indicando dano moderado ao órgão. Ambas as baías apresentaram: dilatação dos capilares glomerulares, hipertrofia glomerular, hipertrofia nuclear, hipertrofia celular, vacuolização citoplasmática, dilatação do lúmen, regeneração tubular, centros melanomacrofágicos e aumento do espaço de Bowman (Figura 39).

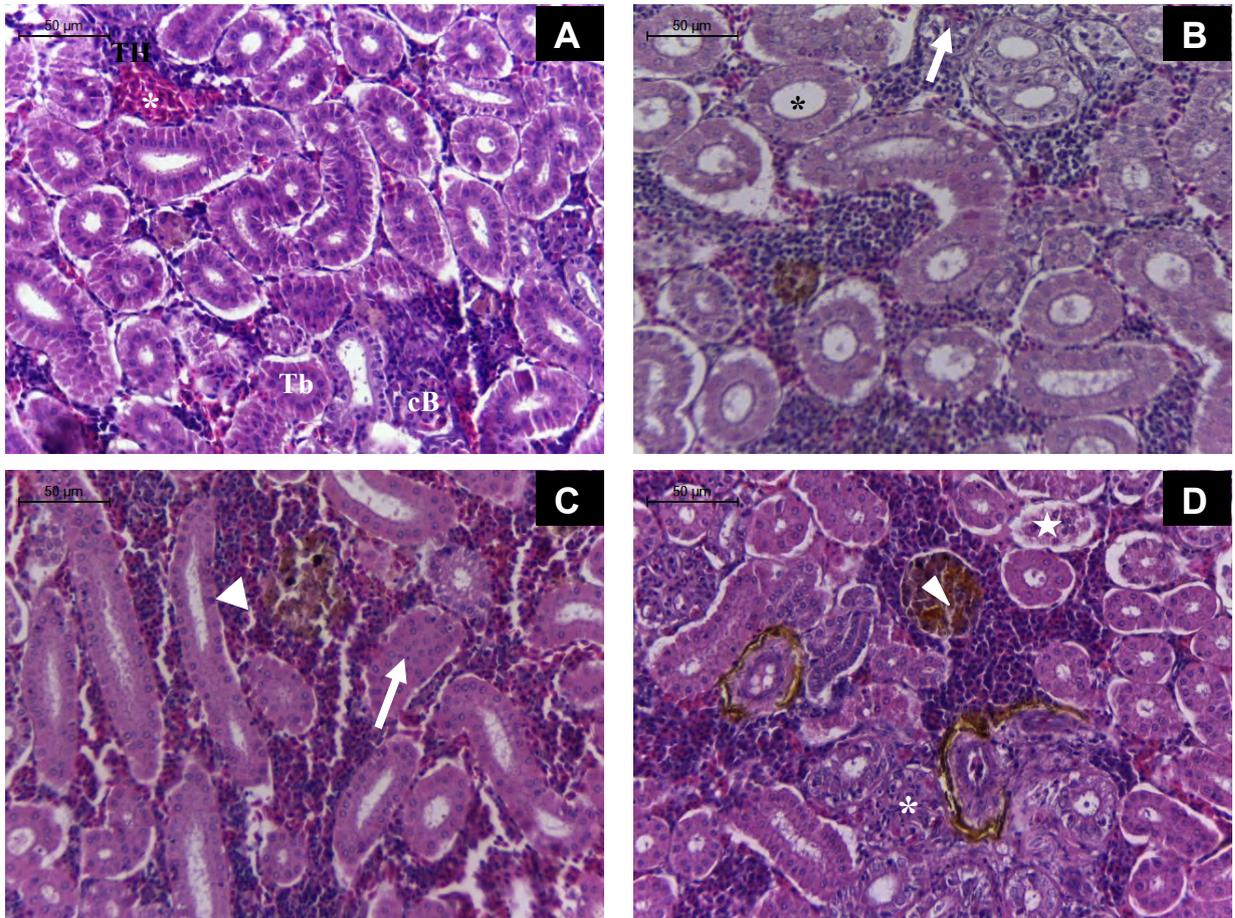


Figura 39. Fotomicrografias de rim das espécies estudadas, indicando alterações histológicas nos rins. (A) Componentes estruturais: tecido hematopoiético (TH), túbulo renal (Tb) e cápsula de Bowman (cB). Alteração histológica: vasodilatação (*); B. Congestão sanguínea na cápsula de Bowman (seta), dilatação do lúmen do túbulo (asterisco); C. Oclusão do lúmen tubular (seta), hipertrofia celular (cabeça de seta); D. Degeneração tubular (★), centro melanomacrofágico (cabeça de seta), hipertrofia glomerular (*). Coloração: HE.

A frequência das alterações histológicas (Tabela 4) indicam que as alterações de estágio II e III são menos frequentes nas espécies coletadas na baía de Paraty, já as de estágio I são frequentes em ambos locais.

Tabela 4. Frequência da ocorrência de alterações histológicas encontradas nos rins de *M. americanus* e *M. furnieri* nas baías de Paraty e Sepetiba.

Alterações histológicas	Baía de Paraty		Baía de Sepetiba	
	<i>M. americanus</i>	<i>M. furnieri</i>	<i>M. americanus</i>	<i>M. furnieri</i>
Corpúsculo				
Dilatação dos capilares glomerulares	80% (8)	90.9% (10)	100% (9)	100% (10)
Hipertrofia glomerular	80% (8)	81.8% (9)	100% (9)	100% (10)
Túbulos				
Hipertrofia nuclear	90% (9)	100% (11)	100% (9)	100% (10)
Hipertrofia celular	100% (10)	100% (11)	100% (9)	100% (10)
Vacuolização citoplasmática	100% (10)	81.8% (9)	100% (9)	100% (10)
Dilatação do lúmen	100% (10)	100% (11)	100% (9)	90% (9)
Regeneração tubular	100% (10)	100% (11)	100% (9)	100% (10)
Melanomacrófagos	90% (9)	81.8% (9)	88.9% (8)	100% (10)

Aumento do espaço de Bowman	80% (8)	81.8% (9)	100% (9)	100% (10)
Congestão sanguínea na cápsula de Bowman	40%* (4)	27.3%* (3)	88.9% (8)	90% (9)
Degeneração tubular (citoplasmático)	60%* (6)	72.7% (8)	100% (9)	90% (9)
Aumento do calibre do lúmen tubular	70%* (7)	63.6%* (7)	100% (9)	100% (10)
Necrose	40%* (4)	45.5%* (5)	88.9% (8)	100% (10)
Total	10	11	9	10

*p < 0.05 vs. grupo baía de Paraty x baía de Sepetiba.

9.3 Discussão

O rim dos teleosteos é um dos primeiros órgãos que são afetados pelos contaminantes presentes na água (THOPHON; KRUATRACHUE; UPATHAM; POKETHITIYOOK *et al.*, 2003). É rico em tecido hematopoiético, e conseqüentemente é o principal local de produção de sangue destes animais (WOOD; YASUTAKE, 1956). As alterações histológicas de estágio I e II

foram encontrados em quase todos os peixes que foram analisados nas baías, porém a necrose teve uma frequência maior nos animais da baía de Sepetiba. A degeneração tubular e alterações no corpúsculo estão relacionadas a peixes que são expostos a água contaminada e com a presença de metais (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; THOPHON; KRUATRACHUE; UPATHAM; POKETHITIYOOK *et al.*, 2003). Neste estudo a degeneração tubular foi caracterizada pela presença de um citoplasma tumefeito, claro e diluído nos túbulos. O processo de degeneração pode evoluir para degeneração hialina, caracterizada pela presença de grandes grânulos eosinofílicos no interior das células (CAMARGO; MARTINEZ, 2007). Estes grânulos podem ser formados dentro das células ou pela reabsorção das proteínas plasmáticas perdidas na urina, indicando danos no corpúsculo (REINERT, 1992; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Em casos mais graves, o processo degenerativo pode levar à necrose tecidual (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). A presença de degeneração tubular, associada à presença de necrose no rim no presente estudo, indica que o rim sofreu danos graves e irreparáveis após a exposição à água poluída da baía de Sepetiba.

Os rins são o principal local de produção de sangue dos peixes, e por isso, os xenobióticos presentes no sangue podem provocar alterações histológicas na cápsula de Bowman. O aumento do espaço da cápsula de Bowman, e consequente formação de edema foram relatados por outros pesquisadores em trabalhos realizados com peixes expostos ao acetato de chumbo, a herbicidas e expostos a metais pesados (HERMENEAN; DAMACHE; ALBU; ARDELEAN *et al.*, 2015; CRUZ; SILVIA; LIA; ADILSON *et al.*, 2016).

Centros de melanomacrófagos foram observados no hepatopâncreas e no tecido hematopoiético do rim, como descrito na literatura (ROBERTS, 1978). Essas estruturas contêm diferentes pigmentos, como a melanina, hemossiderina, lipofucsina, pigmento lipogênico que podem auxiliar nos mecanismos de defesa do hospedeiro (ROBERTS, 1978). A melanina pode absorver ou neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (ZUASTI; JIMÉNEZ-CERVANTES; GARCÍA-BORRÓN; FERRER, 1998) e tem importância na produção de compostos bactericidas especialmente, peróxido de hidrogênio (WOLKE; MURCHELANO; DICKSTEIN; GEORGE, 1985). Handy & Penrice, 1993 encontraram células da cápsula de Bowman hipertrofiadas e melanomacrófagos no rim de truta (*Salmo trutta*) e tilápia (*Oreochromis mossambicus*) expostos ao cloreto de mercúrio. Alterações semelhantes foram encontradas em peixes expostos a contaminantes orgânicos

(VEIGA; RODRIGUES; PACHECO; RANZANI-PAIVA, 2002) e contaminantes ambientais mistos (SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997; PACHECO; MONTEIRO SANTOS, 2002). Os peixes da baía de Paraty, aparentemente, apresentaram uma menor frequência de centros melamomacrofágicos quando comparados com os peixes da baía de Sepetiba. Este resultado pode ser um índice da resposta do organismo aos xenobióticos.

Em alguns casos observamos a oclusão dos túbulos renais, isto pode ocorrer pelo acúmulo de certos materiais no lúmen (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Essa alteração prejudica a fluxo do filtrado e atrasa os processos de reabsorção e secreção no túbulo (RAND; PETROCELLI, 1985; HINTON; BAUMANN; GARDNER; HAWKINS *et al.*, 1992).

9.4 Conclusão

Verificou-se que o padrão histomorfológico dos rins dos peixes *M. americanus* e *M. furnieri* é semelhante. Foram observadas alterações histológicas nos rins dos peixes estudados e esse resultado evidencia a resposta à contaminação por xenobióticos inespecíficos encontrados nos locais avaliados. Estas alterações histológicas observadas nos rins de *M. americanus* e *M. furnieri* podem distinguir a baía de Paraty (área de referência) da baía de Sepetiba (potencialmente contaminada). A maior ocorrência de lesões do estágio III na baía de Sepetiba mostra que os peixes estão enfrentando estresse devido aos poluentes presentes na água. Portanto, alterações histológicas podem ser consideradas biomarcadores úteis para medir a contaminação ambiental nas baías de Paraty e Sepetiba.

CAPÍTULO III

Análise histológica de alterações em hepatopâncreas de peixes e sua utilização como biomarcadores de impactos ambientais nas baías de Paraty e Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

Os estuários são reservatórios de uma grande variedade de contaminantes, incluindo metais pesados e compostos orgânicos de origem antropogênica. A família Sciaenidae apresenta uma grande plasticidade ecofisiológica e são tolerantes a um amplo espectro de variação de parâmetros físicos e químicos da água, sendo assim adequada para o monitoramento ambiental. Os peixes são considerados bons bioindicadores ambientais de contaminação por metais, pois estão no ápice da cadeia alimentar. Quando incorporados pelos peixes, os poluentes podem ser acumulados no hepatopâncreas e a exposição a contaminantes leva este órgão a apresentar alterações histológicas. Neste sentido, este estudo relata a incidência de alterações histológicas encontradas nos hepatopâncreas das espécies de peixes marinhos *Menticirrhus americanus* (LINNAEUS, 1758) e *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823), que foram coletados na baía de Sepetiba (local poluído) e na baía de Paraty (área de referência) como bioindicador para medir a qualidade ambiental. No presente estudo foi analisado, um total de 58 hepatopâncreas de *M. americanus* e *M. furnieri* nas baías de Paraty e Sepetiba. As alterações histológicas observadas nos hepatopâncreas dos peixes coletados na baía de Sepetiba contrastam com os coletados na baía de Paraty, no que diz respeito ao tipo e gravidade de lesões observadas. Alterações histológicas de estágio I foram encontradas em quase todos os peixes das baías de Paraty e Sepetiba, enquanto as alterações de estágio II e III tiveram uma frequência maior nos espécimes da baía de Sepetiba, sendo estas consideradas lesões de maior severidade. Com base nos resultados, a alta incidência de alterações de estágio II e III em *M. americanus* e *M. furnieri* nos peixes da baía de Sepetiba é uma evidência da má qualidade ambiental. Assim sendo, foi possível concluir que as alterações histológicas podem ser relacionadas à indicação da qualidade do ambiente aquático.

Palavras-chave: morfologia; estuários; Sciaenidae; hepatopâncreas.

ABSTRACT

Estuaries are reservoirs of a wide variety of contaminants, including heavy metals and organic compounds of anthropogenic origin. The Sciaenidae family has a great ecophysiological plasticity and are tolerant to a wide range of physical and chemical parameters of water, thus being suitable for environmental monitoring. Fish are considered good environmental bioindicators, due to metal contamination as they are at the apex of the food chain. When incorporated by fish, pollutants can accumulate in the hepatopancreas and exposure to contaminants causes this organ to present histological changes. In this sense, this study reports the incidence of histological changes found in the hepatopancreas of marine fish species *Menticirrhus americanus* (LINNAEUS, 1758) and *Micropogonias furnieri* (DESMAREST, 1823), which were collected from Sepetiba bay (polluted site) and Paraty bay (reference area) as a bioindicator for measuring environmental quality. In the present study, a total of 58 *M. americanus* and *M. furnieri* hepatopancreas were analyzed in the Paraty and Sepetiba bays. The histological changes observed in the hepatopancreas of fish collected in Sepetiba bay contrast with those collected in Paraty bay, regarding the type and severity of observed lesions. Histological alterations of stage I were found in almost all Paraty and Sepetiba bay, while stage II and III alterations were more frequent in Sepetiba bay specimens, which were considered to be more severe lesions. Based on the results, the high incidence of stage II and III changes in the *M. americanus* and *M. furnieri* in Sepetiba bay is evidence of poor environmental quality. Thus, it was concluded that the histological changes may be related to the indication of the quality of the aquatic environment.

Keywords: morphology; estuary; Sciaenidae; hepatopancreas.

10.1 Objetivos Específicos

- Descrever o padrão histomorfológico do hepatopâncreas dos peixes *M. americanus* e *M. furnieri*.
- Analisar e classificar as possíveis alterações histológicas para avaliar o uso destas, nas espécies analisadas, como biomarcador da exposição prévia a estressores ambientais.
- Comparar os resultados obtidos nas análises histológicas do hepatopâncreas destas duas espécies de ceniídeos, visando gerar dados relacionados à resposta biológica ocorrida após possível exposição de misturas de xenobióticos nestes diferentes ecossistemas marinhos localizados no Rio de Janeiro.

10.2 Resultados

Análise histológica

Na histologia das espécies investigadas foi observada a presença de tecido pancreático exócrino distribuído pelo parênquima hepático. Foi constatada a organização do parênquima em células glandulares ou ácinos glandulares, que é a parte a exócrina do pâncreas, cujo citoplasma é basofílico, exceto na parte apical, onde é acidofílico devido à presença de grânulos de secreção. O núcleo encontra-se localizado na região basal da célula. O tecido exócrino pancreático nestes peixes está localizado no fígado, sendo assim esse órgão denominado de hepatopâncreas (EL BAKARY; EL-GAMMAL, 2010); o pâncreas exócrino intra-hepático está organizado em aglomerados de células colunares, organizadas em ácinos (Figura 40).

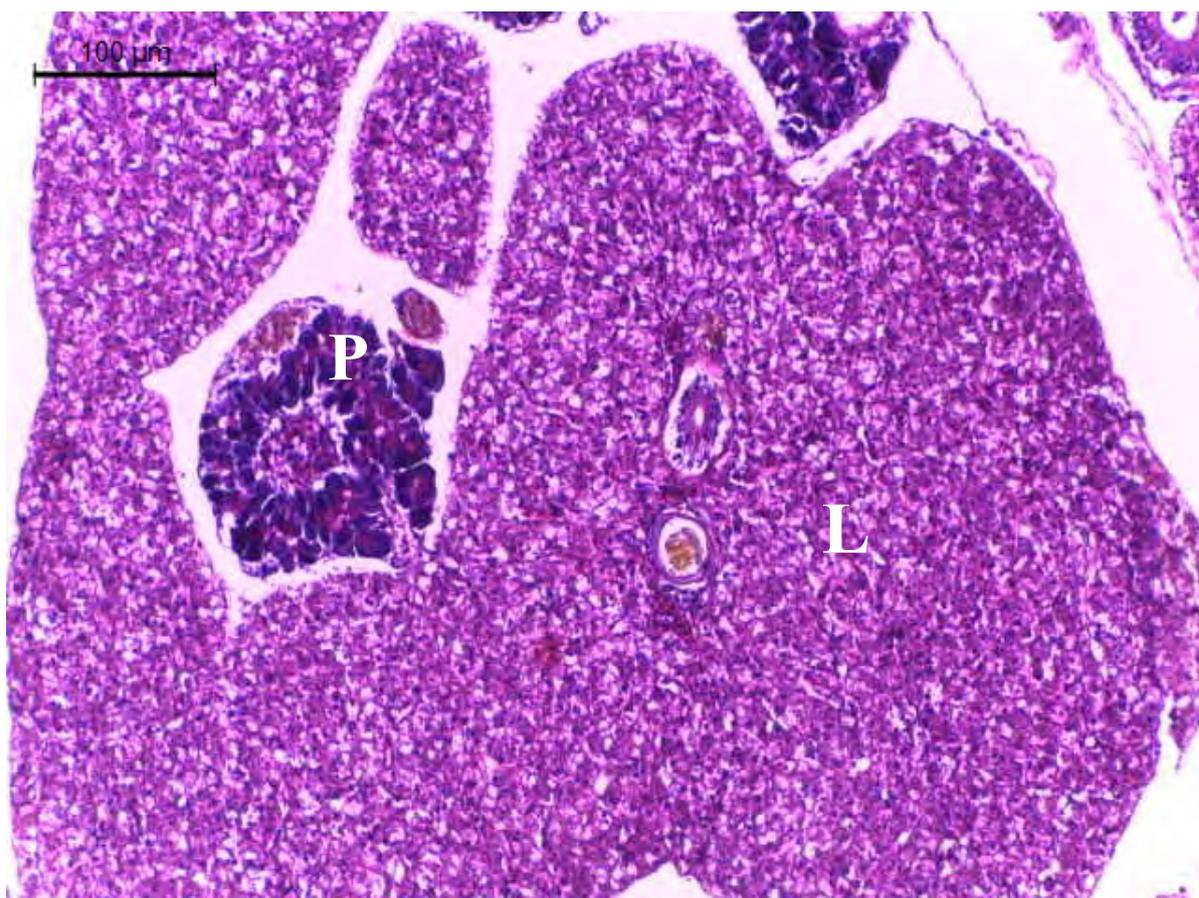


Figura 40. Fotomicrografia do hepatopâncreas da *M. furnieri*. Hepatopâncreas formado por aglomerados de ácinos pancreáticos (P) distribuídos ao redor do fígado (L). Coloração: HE.

A forma intra-hepática é localizada ao redor dos ramos da veia porta (Figura 40 A), e é separado do parênquima hepático através de uma fina camada de tecido conjuntivo, composta principalmente por fibras colágenas (Figura 41 B). As fibras colágenas também são encontradas ao redor dos ductos biliares (Figura 41 A e B).

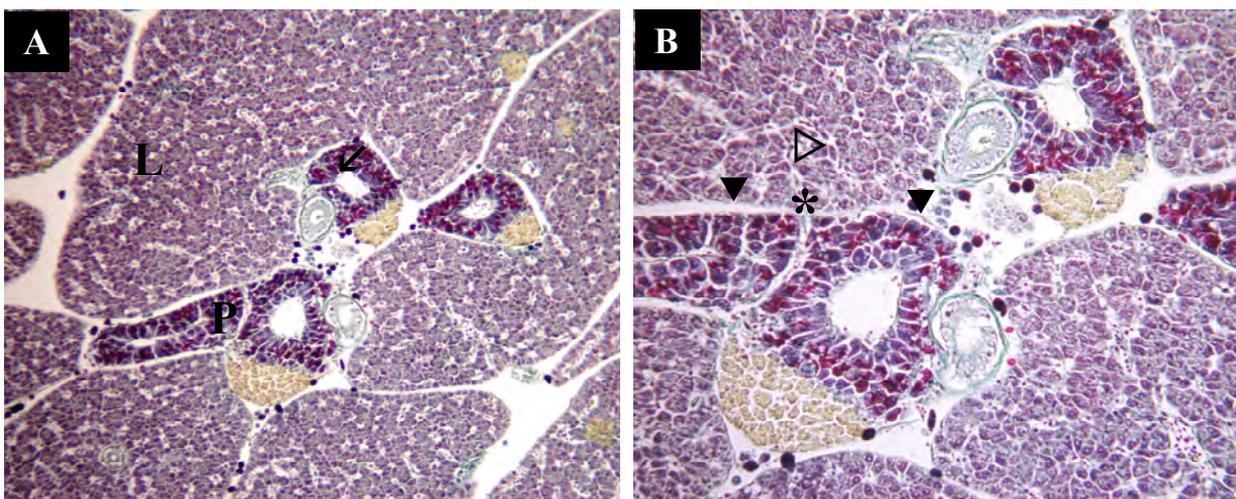


Figura 41. Fotomicrografias do hepatopâncreas. A - Demonstração do órgão formado por aglomerados de ácinos pancreáticos (P) distribuídos em torno dos ramos da veia porta (◁) do fígado (L). B - Tecido pancreático exócrino (*) separado do parênquima hepático (▷) por uma fina camada de cápsula do tecido conjuntivo (◀). Coloração: TG.

No presente estudo não foi possível evidenciar as tríades portais e as subdivisões hexagonais que caracterizam os lóbulos hepáticos. O hepatopâncreas é constituído por hepatócitos organizados em placas celulares, circundadas por sinusoides. Os hepatócitos são células arredondadas com citoplasma claro, apresentando núcleo esférico e basófilo. A rede de capilares sanguíneos apresenta vasos anastomosados e drenados pelas veias centro-lobulares (AKIYOSHI; INOUE, 2004; BOMBONATO; ROCHEL; VICENTINI; FRANCESCHINI-VICENTINI, 2007). Os ductos biliares observados apresentam um epitélio cúbico simples (VICENTINI; FRANCESCHINI-VICENTINI; BOMBONATO; BERTOLUCCI *et al.*, 2005; FACCIOLI; CHEDID; BOMBONATO; VICENTINI *et al.*, 2014), e é o local onde a bile produzida no hepatócito é secretada.

Durante a ontogênese, o tecido pancreático exócrino é formado ao redor da veia portal e penetra profunda e difusamente no parênquima do fígado (VICENTINI; FRANCESCHINI-VICENTINI; BOMBONATO; BERTOLUCCI *et al.*, 2005). O tecido pancreático exócrino é responsável pela produção de enzimas digestivas que atuam no intestino e auxiliam na digestão dos alimentos (GONZALEZ; CRESPO; BRUSLE, 2005).

Os centros melanomacrófagos (CMMs) presentes no parênquima hepático das espécies são formados por células que acumulam diferentes materiais em seu interior, podendo estar relacionados com o estado nutricional dos peixes. Segundo Hartley *et al.* (1996), os CMMS são elementos críticos do sistema imune de peixes, incluindo resposta imune contra materiais de origem externa. Acredita-se que os CMMs acumulam pigmentos no interior de suas células, tais como lipofuscina, melanina, ceróide e hemossiderina entre outras substâncias. Os melanomacrófagos estão localizados próximos às regiões portais e organizam-se formando centros melanomacrófagos (CMMCs). O hepatopâncreas de *M. furnieri* e *M. americanus* apresentou marcação para hemossiderina (Figura 42). A hemossiderina é um pigmento de ferro (Fe^{+++}) e resulta da degradação dos eritrócitos, sendo encontrado no fígado de peixes (WOLKE, 1992; VELKOVA-JORDANOSKA; KOSTOSKI, 2005; LEKNES, 2015). Foi observado o aumento de hemossiderina no hepatopâncreas (hemossiderose) de teleósteos coletados em ambiente poluídos (PRONINA; MARINA; PRONIN, 2014).

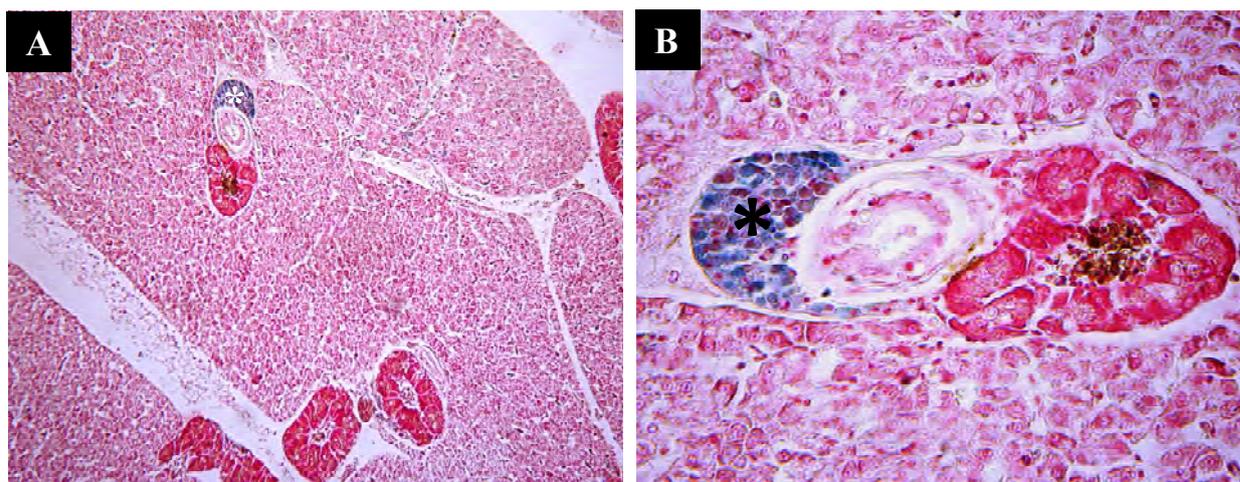


Figura 42. Fotomicrografias do hepatopâncreas. Marcação de hemossiderina no hepatopâncreas de teleósteos (*). Coloração: PERLS. Aumentos: 150 x e 800x

As fibras reticulares são formadas por colágeno tipo III colágeno associado a carboidratos que tem sido amplamente descrita no fígado e baço dos vertebrados (USHIKI, 2002). Os fibroblastos são responsáveis pela síntese das fibras reticulares, que sustentam células e vasos sanguíneos (USHIKI, 2002). Além disso, essas fibras formam a membrana basal e são consideravelmente mais finas que as fibras colágenas. Os sais de prata reagem com os componentes de carboidratos presentes nessas fibras e as impregna, resultando na marcação de preto; fibras de colágeno mais espessas são marrons (USHIKI, 2002). O hepatopâncreas das espécies estudadas apresentou pequena quantidade de fibras reticulares pelo método de impregnação pela prata (Figura 43A). A disposição das fibras reticulares no fígado é geralmente acompanhada de estruturas hepatócito-sinusoidais e vasos (Figura 43B).

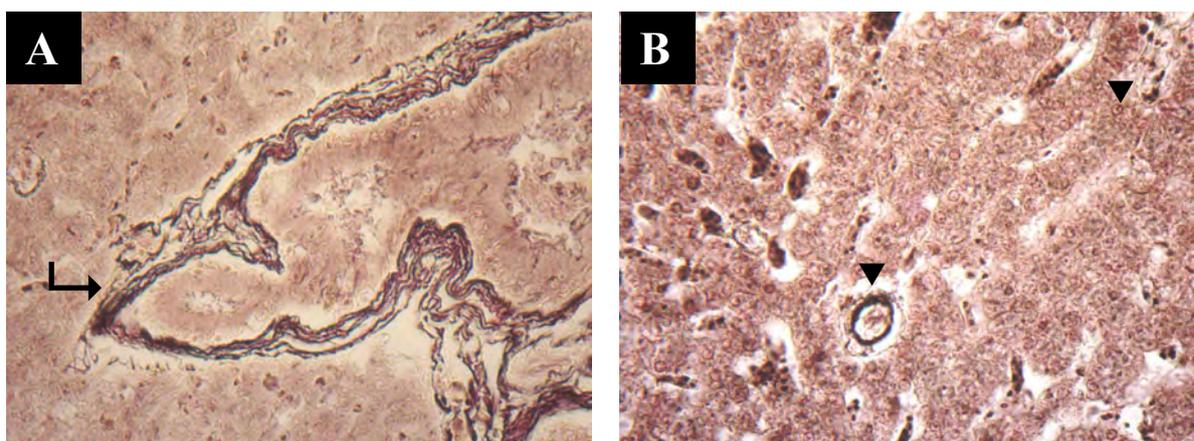


Figura 43. (A) Impregnação de fibras reticulares no hepatopâncreas (↪); (B) Grânulos de hemossiderina destacados em vasos (▼). Aumento: 1150x. Coloração: Técnica de Gomori.

Alterações histológicas

As alterações histológicas encontradas no hepatopâncreas foram classificadas de acordo com as alterações propostas por (MARTINEZ; NAGAE; ZAIA; ZAIA, 2004), no qual ocorre a divisão em três diferentes estágios, de modo que as alterações são agrupadas de acordo com os níveis modificação da arquitetura tecidual. Assim pode ser observado: **estágio I:** hipertrofia nuclear, núcleos irregulares, posição lateral do núcleo, hipertrofia celular, vacuolização citoplasmática, grânulos eosinofílicos no citoplasma, centros melanomacrofágicos; **estágio II:**

vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática, congestão sanguínea, estagnação biliar;
estágio III: necrose.

- **Hipertrofia nuclear e celular:** ocorre alteração no tamanho e/ou na proporção do número de núcleos dos hepatócitos e das células da porção pancreática (Figura 44).

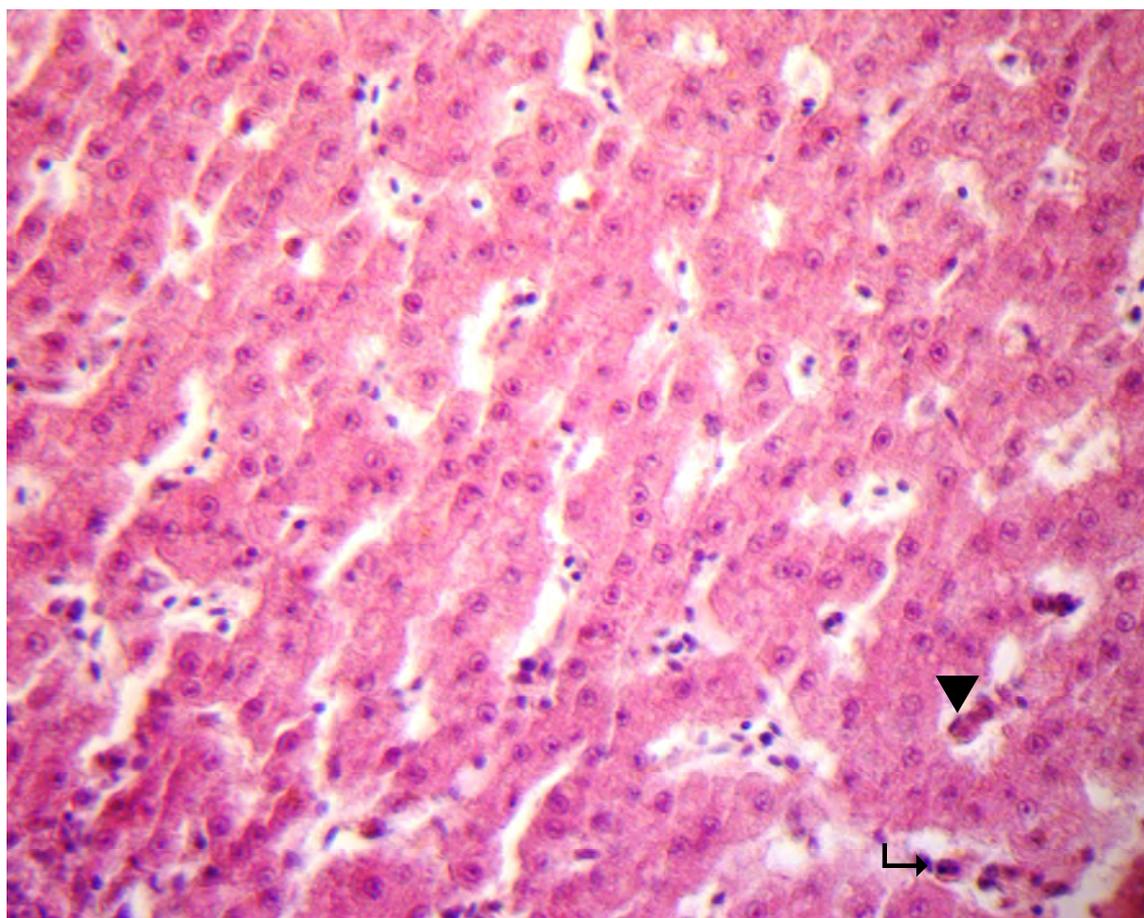


Figura 44. Presença de hepatócitos com alteração no tamanho do núcleo (↪) e da célula (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Núcleos irregulares e posição lateral do núcleo:** nesta alteração a célula se retrai, e seu citoplasma torna-se cada vez mais denso e mais corado. Seus limites celulares e nucleares mostram-se irregulares ou mais lateralizados (Figura 45).

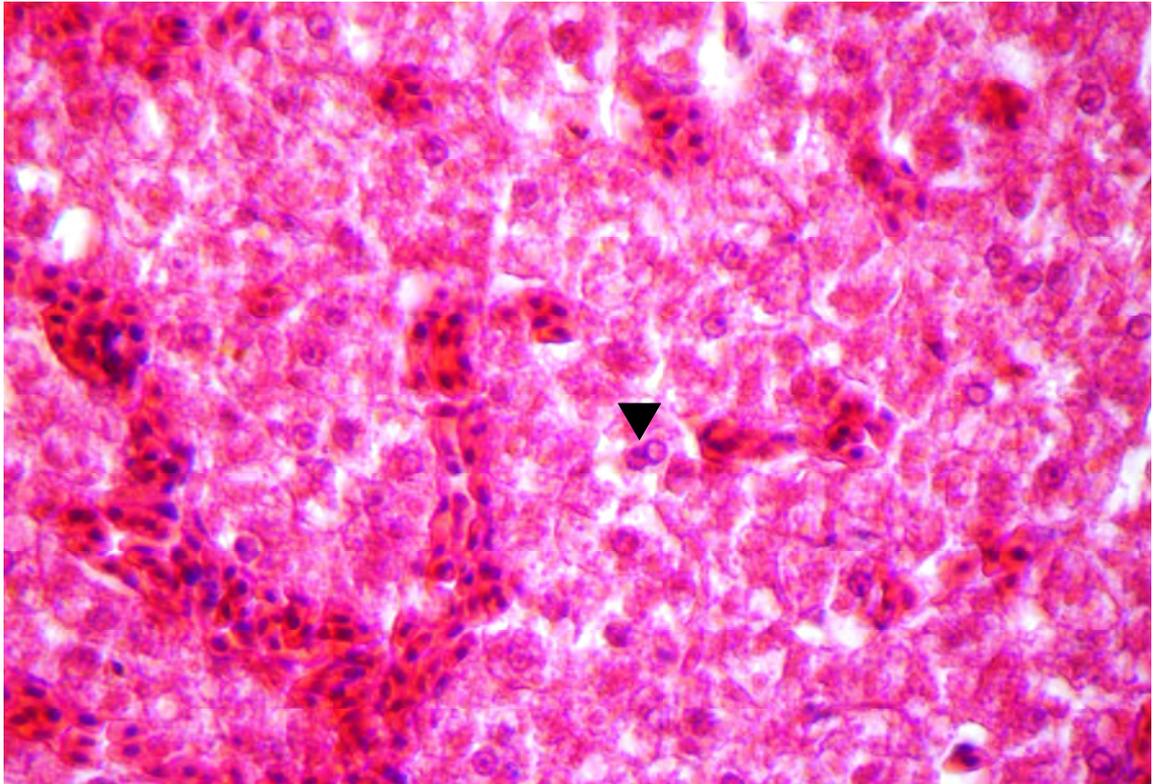


Figura 45. Parênquima hepático com a presença de núcleos comprimidos lateralmente e irregulares (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Vacuolização citoplasmática e nuclear:** alteração é caracterizada pela presença de formações circulares de coloração negativa localizada no citoplasma celular, e no interior de núcleos celulares (Figura 46) respectivamente.

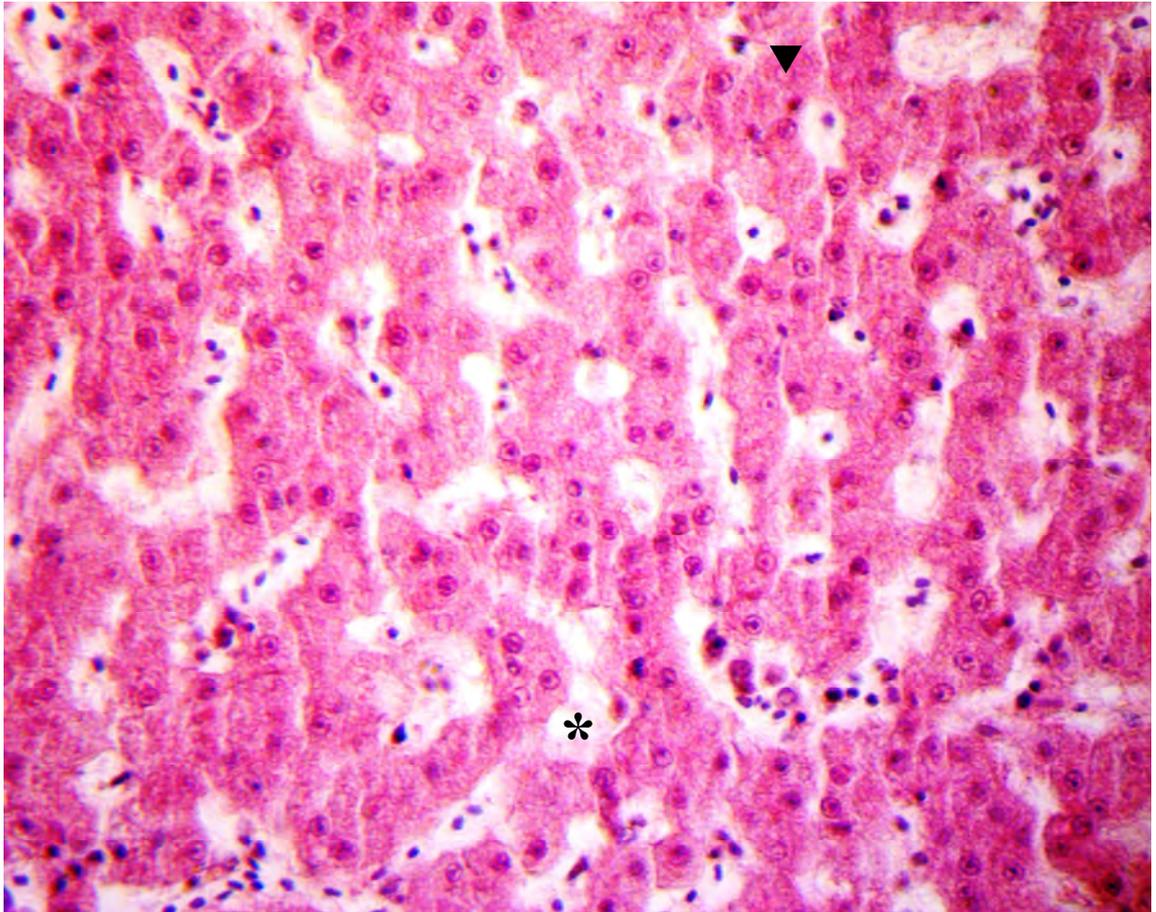


Figura 46. Hepatopâncreas apresentando áreas com alterações no citoplasma, vacuolização citoplasmática (▼) e no núcleo (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Grânulos eosinofílicos:** células apresentam grânulos difusos pelo citoplasma de formato arredondado (Figura 47), que se diferenciam dos heterofílos por serem granulações menores, no citoplasma celular. Elas podem ser observadas agregadas.

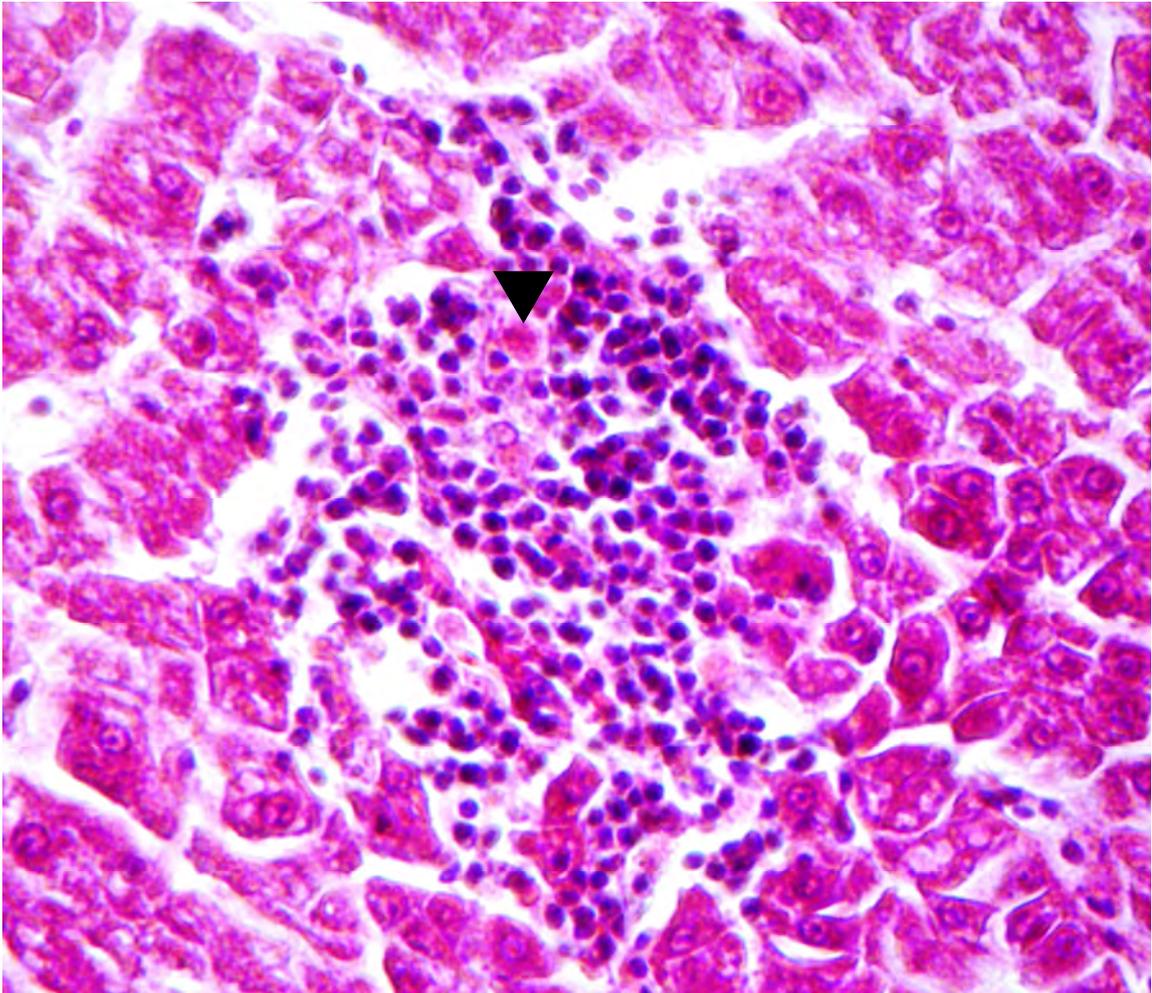


Figura 47. Grânulos eosinofílicos difusos no citoplasma (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Congestão sanguínea e centros melanomacrofágicos:** a congestão sanguínea (Figura 48) é o acúmulo de grande número hemácias dispostas no interior dos vasos sanguíneos. Os centros melanomacrofágicos (Figura 48) são formados por macrófagos, tais como células fagocitárias e fragmentos, principalmente de eritrócitos e pigmentos, como melanina, hemossiderina e lipofuscina.

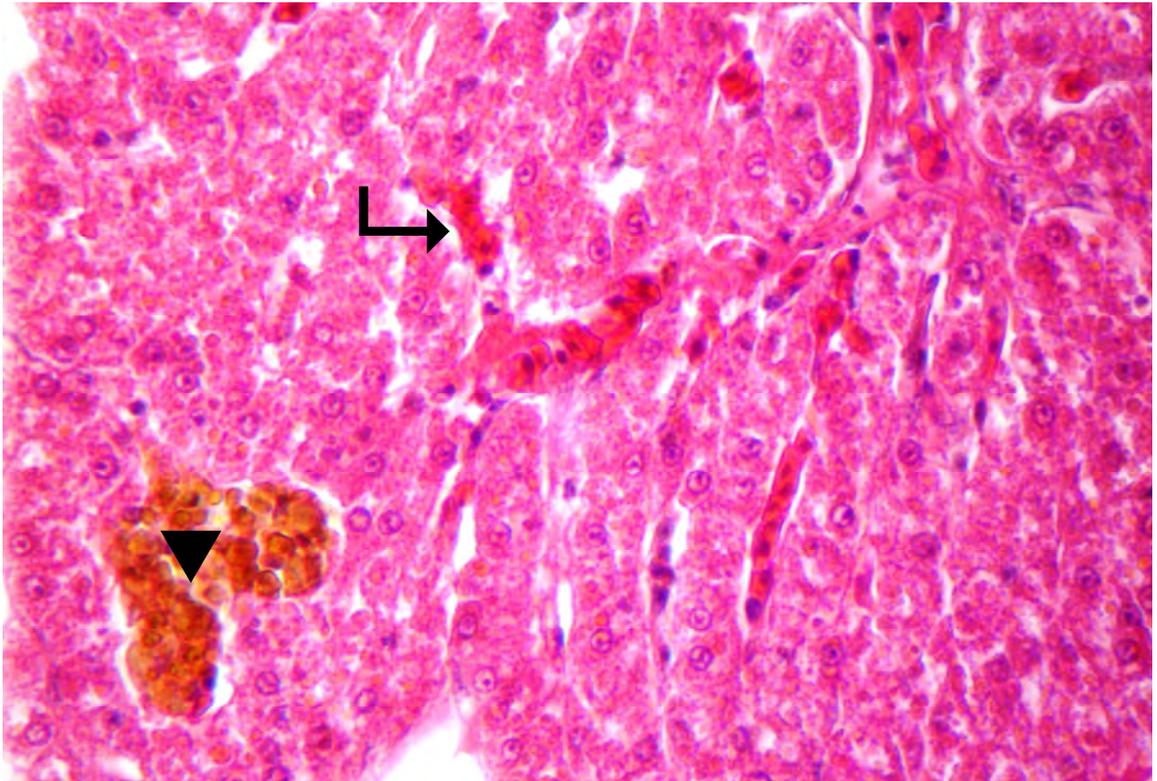


Figura 48. Porção do hepatopâncreas indicando congestão sanguínea (↪), além de características focais de cor marrom-pálida centro de melanomacrófagos (▼). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Estagnação biliar:** presença de um depósito de material amorfo, granular de aspecto amarelado (Figura 49).

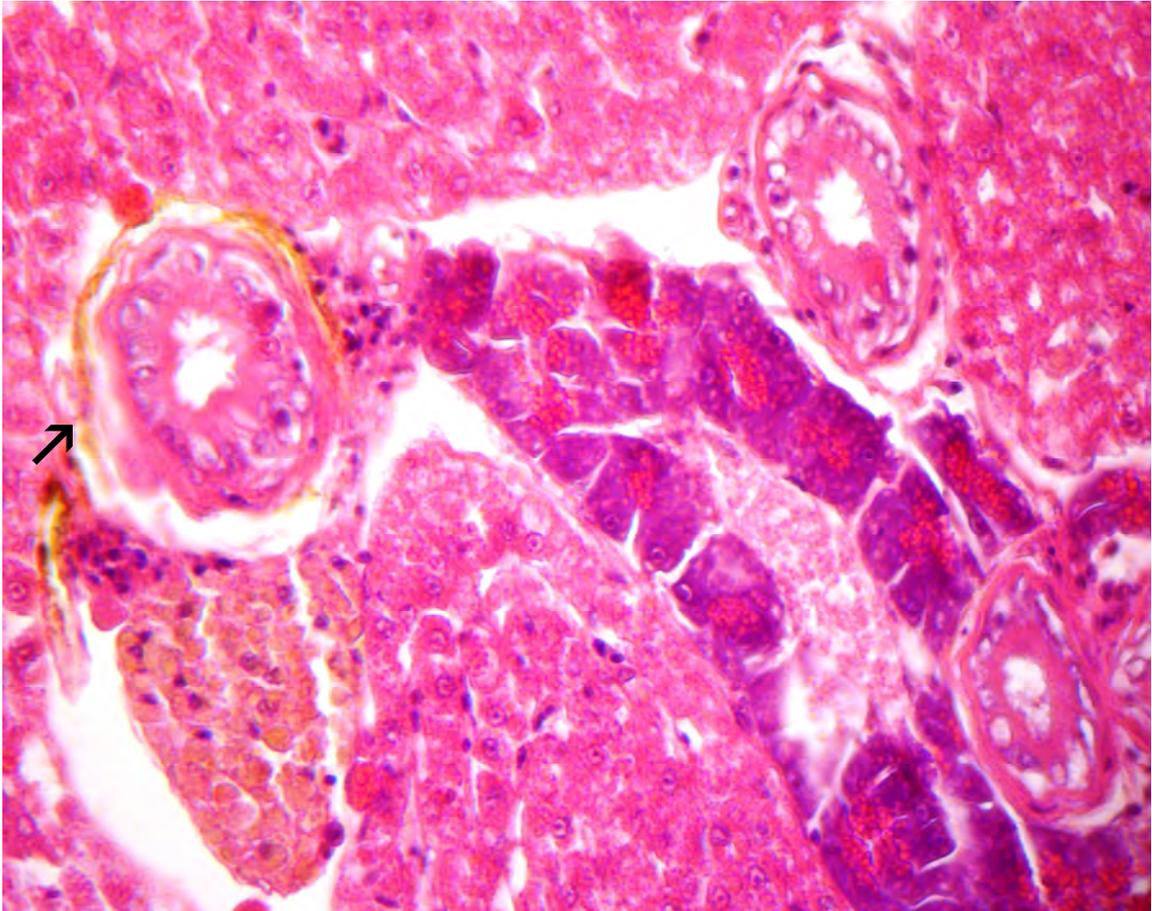


Figura 49. Alteração resultante de doença biliar ou obstrução dos ductos biliares no hepatopâncreas (↗). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

- **Necrose:** graves alterações no núcleo celular. O citoplasma sofre previamente alterações deixando-o intensamente eosinofílico.

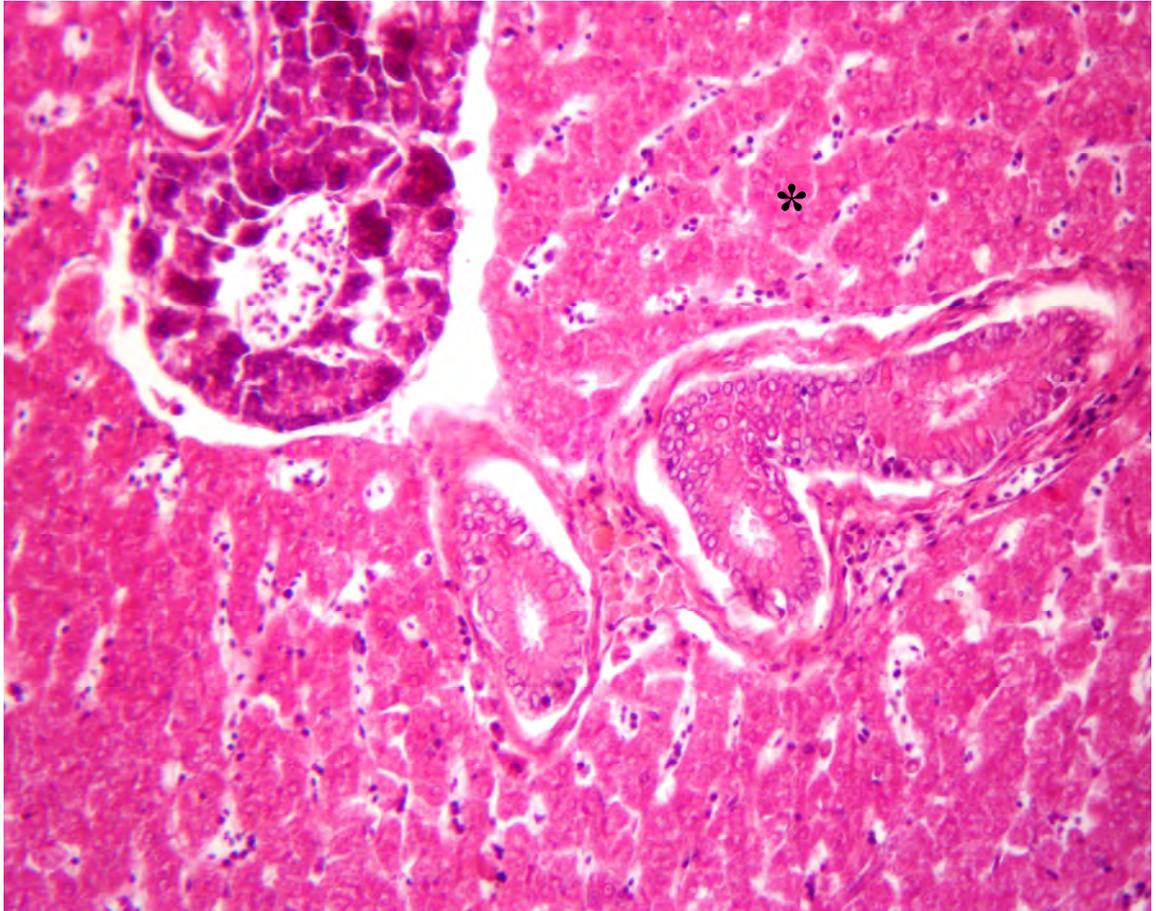


Figura 50. Parênquima hepático com presença hepatócitos de citoplasma tumefeito, claro, e núcleo de aspecto necrótico, ou ausência de núcleo (*). Coloração: HE. Aumento: 1150x.

Foram analisados 21 hepatopâncreas de espécies provenientes da baía de Paraty (10 *M. americanus* e 11 *M. furnieri*) e 20 da baía de Sepetiba (10 *M. americanus* e 10 *M. furnieri*) (Tabela 5). Após realizar a análise de todas as lâminas o valor de VMA foi calculado para cada animal pela fórmula: $VMA = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$ (SCHWAIGER; WANKE; ADAM; PAWERT *et al.*, 1997). Valores de VMA entre 0 e 10 indicam funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 apontam dano leve ao órgão; valores entre 21 e 50 assinalam mudanças moderadas no órgão; valores entre 50 e 100 indicam lesões graves e valores acima de 100 apontam dano irreversível ao órgão (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC, 1994).

Os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas entre as espécies. De acordo com o esperado, todos os hepatopâncreas analisados da baía de Sepetiba apresentaram um VMA acima de 100, indicando dano irreversível ao órgão. Enquanto o hepatopâncreas analisado da baía de Paraty apresentaram os valores de VMA entre 20 e 100, indicando dano moderado a grave ao órgão.

A frequência das alterações histológicas (Tabela 5) indica que as alterações de estágio III são menos frequentes nas espécies coletadas na baía de Paraty, já as de estágio I e II são frequentes em ambos os locais.

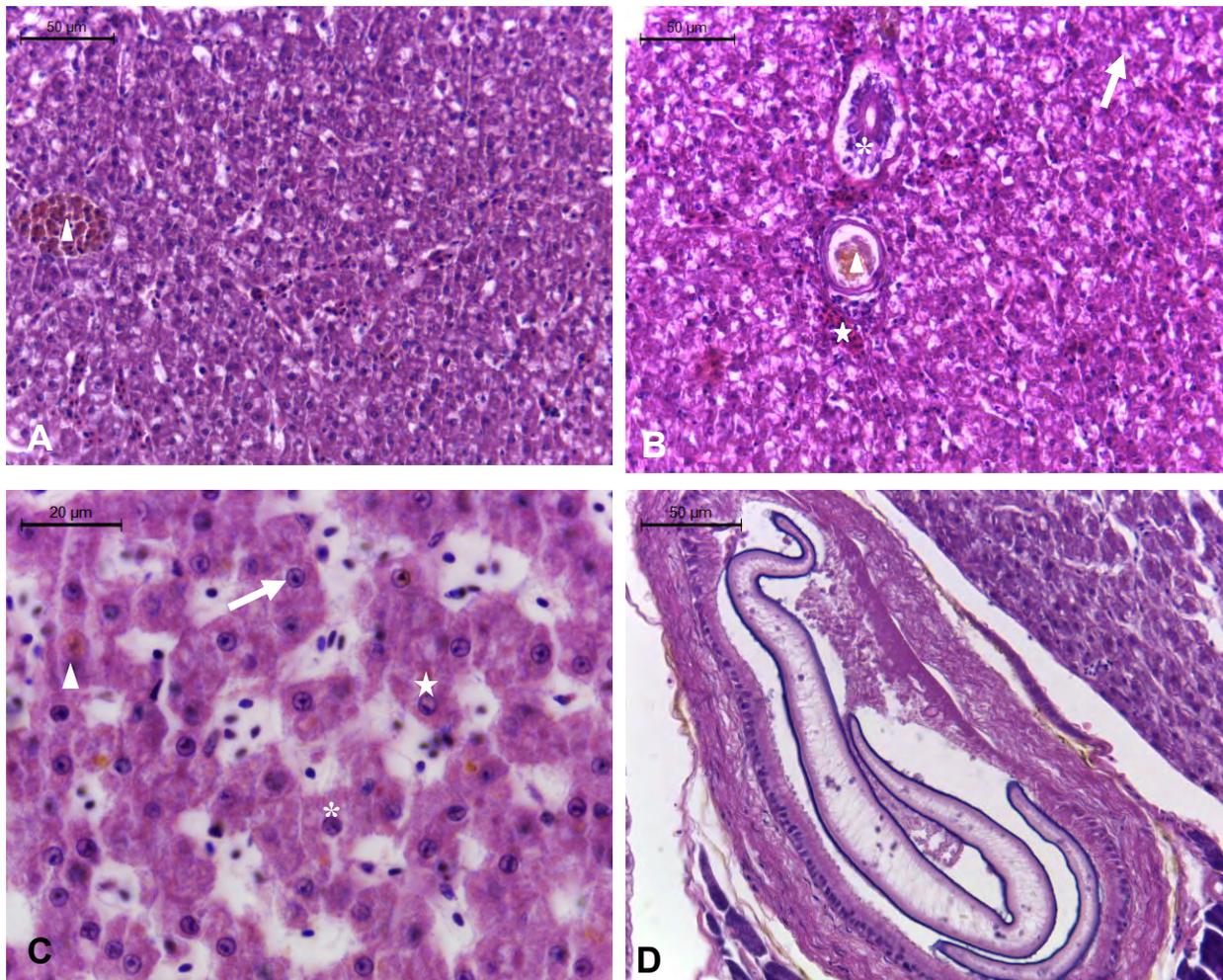


Figura 51. Fotomicrografias do hepatopâncreas de *M. americanus* e *M. furnieri*, indicando alterações histológicas. A - Agregado melanomacrofágico (cabeça de seta); B. Ducto biliar (asterisco), veia (cabeça de seta), congestão sanguínea (estrela), degeneração (seta); C. Sinusoides (asterisco), hepatócitos (seta), estagnação biliar (cabeça de seta), hipertrofia nuclear (asterisco), lateralização nuclear (estrela); D. Parasito. Coloração: HE.

A frequência das alterações histológicas (Tabela 5) indica que as alterações de estágio II e III são menos frequentes nas espécies coletadas na baía de Paraty, já as de estágio I são frequentes em ambos os locais.

Tabela 5. Frequência da ocorrência de alterações histológicas encontradas no hepatopâncreas de *M. americanus* e *M. furnieri* nas baías de Paraty e Sepetiba.

Alterações histológicas	Baía de Paraty		Baía de Sepetiba	
	<i>M. americanus</i>	<i>M. furnieri</i>	<i>M. americanus</i>	<i>M. furnieri</i>
Hipertrofia nuclear	100% (10)	100% (11)	100% (10)	100% (10)
Núcleos irregulares	100% (10)	100% (11)	100% (10)	100% (10)
Lateralização nuclear	100% (10)	100% (11)	100% (10)	100% (10)
Hipertrofia celular	100% (10)	90.9% (10)	100% (10)	90% (9)
Vacuolização citoplasmática	100% (10)	63.6% (7)	70% (7)	80% (8)
Grânulos eosinofílicos	40% (4)	27.3%* (3)	60% (6)	80% (8)
Melanomacrófagos	40%* (4)	36.7%* (4)	80% (8)	70% (7)
Vacuolização nuclear	50%* (5)	63.6%* (7)	90% (9)	100% (10)
Degeneração citoplasmática	30%* (3)	27.3%* (3)	100% (10)	100% (10)
Congestão sanguínea	40%* (4)	36.7%* (4)	90% (9)	80% (8)
Estagnação biliar	70%* (7)	36.7% (4)	50% (5)	50% (5)
Necrose	30%* (3)	27.3%* (3)	70% (7)	70% (7)
Total	10	11	10	10

*P < 0.05 vs. grupo baía de Paraty x baía de Sepetiba.

10.3 Discussão

O órgão mais associado ao processo de desintoxicação e biotransformação é o fígado, isto ocorre devido a sua função, posição e suprimento sanguíneo (DER; BEYER; VERMEULEN, 2003), ele é também um dos órgãos mais afetados por contaminantes na água (RODRIGUES; FANTA, 1998).

Foram encontradas alterações histológicas em órgãos coletados nas baías de Paraty e Sepetiba. Hepatócitos de formato irregular, vacuolização citoplasmática e núcleo em posição lateral, próximos à membrana celular também foram descritas no teleósteo *Corydoras paleatus* que se encontrava em local contaminado por pesticidas organofosforados (FANTA; RIOS;

ROMAO; VIANNA *et al.*, 2003). Estas alterações foram encontradas com maior frequência nos animais coletados na baía de Sepetiba (CAMARGO; MARTINEZ, 2007) .

A estagnação biliar foi identificada como grânulos amarelo-acastanhados no citoplasma, enquanto os centros melanomacrofágicos foram identificados como agregados arredondados de células contendo grânulos amarelo-escuro de vários tamanhos, normalmente próximos aos vasos, respectivamente (CAMARGO; MARTINEZ, 2007). A presença de estagnação biliar e de centros melanomacrofágicos em grande quantidade no hepatopâncreas é uma forte evidência de que esses órgãos sofreram danos estruturais e metabólicos devido à exposição à água poluída do riacho Cambé, reforçando a ideia de que esse ambiente está realmente prejudicado (CAMARGO; MARTINEZ, 2007). A estagnação biliar é caracterizada pela presença de bile na forma de grânulos amarelo-acastanhados no citoplasma dos hepatócitos (PACHECO; MONTEIRO SANTOS, 2002), indica que a bile não está sendo liberada do fígado. Esse acúmulo de bile indica possíveis danos ao metabolismo hepático (FANTA; RIOS; ROMAO; VIANNA *et al.*, 2003). Estes achados são similares aos encontrados nos espécimes coletados em ambas as baías do presente estudo (Tabela 5). Estudos histológicos e ultra-estruturais realizados em *Hemigrammus marginatus*, de áreas com baixo nível de poluição, revelaram a ausência dos centros melanomacrofágicos, em contraposição aos grandes e numerosos centros encontrados em *Oreochromus niloticus*, coletados em áreas de maior impacto ambiental (BOMBONATO; ROCHEL; VICENTINI; FRANCESCHINI-VICENTINI, 2007).

Os sinais de degeneração (degeneração nuclear e vacuolização nuclear) além da necrose focal indicam que as alterações histológicas são mais severas e são associadas à exposição dos peixes à contaminação por metais, como cobre (PARIS-PALACIOS; BIAGIANTI-RISBOURG; VERNET, 2000) e mercúrio (RIBEIRO; BELGER; PELLETIER; ROULEAU, 2002), e por bifenilos policlorados (PCBs) (CHANG; LIU; YUAN, 2001). A presença de necrose foi relevante nos animais coletados na baía de Sepetiba (Tabela 5).

10.4 Conclusão

Os resultados mostraram que as alterações histológicas observadas no hepatopâncreas das espécies *M. americanus* e *M. furnieri* coletadas na baía de Sepetiba fornecem ferramentas toxicológicas úteis e sensíveis. Além disso, as espécies utilizadas no estudo são bioindicadoras, sendo interessante sua utilização em experimentos que envolvam contaminantes ambientais, devido à sua facilidade de adaptação às condições experimentais e sua posição na cadeia alimentar. Este estudo reforça o desenvolvimento da histologia como uma ferramenta importante para monitorar efeitos da contaminação em estuários.

11. REFERÊNCIAS

ABDEL-MONEIM, A. Histopathological and ultrastructural perturbations in tilapia liver as potential indicators of pollution in Lake Al-Asfar, Saudi Arabia. **Environmental science and pollution research international**, 21, 12/10 2013.

ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. **Amer. Fish. Soc.**, 3, p. 104-112, 01/01 2002.

AKIYOSHI, H.; INOUE, A. Comparative Histological Study of Teleost Livers in Relation to Phylogeny. **Zoological science**, 21, p. 841-850, 09/01 2004.

AL-MADFA, H.; ABDEL-MOATI, M.; AL-GIMALY, F. *Pinctada radiata* (Pearl Oyster): A Bioindicator for Metal Pollution Monitoring in the Qatari Waters (Arabian Gulf). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 60, p. 245-251, 03/01 1998.

ARAÚJO, F. G.; CRUZ-FILHO, A. G. D.; AZEVÊDO, M. C. C. D.; SANTOS, A. C. D. A. Estrutura da comunidade de peixes demersais da baía de Sepetiba, RJ. **Revista Brasileira de Biologia**, 58, p. 417-430, 1998.

BANERJEE, T. K.; CHANDRA, S. Histopathological analysis of the respiratory organs of *Clarias batrachus* (Linnaeus) subjected to the stress of air-exposure. **Acta Zool Taiwanica**, 14, p. 45-64, 01/01 2003.

BARCELLOS, C.; LACERDA, L. D. D. Cadmium and zinc source assessment in the Sepetiba Bay and basin region. **Environmental Monitoring and Assessment**, 29, p. 183-199, 1994.

BEN AMEUR, W.; DE LAPUENTE, J.; EL MEGDICHE, Y.; BARHOUMI, B. *et al.* Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in mullet (*Mugil cephalus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver from Bizerte Lagoon (Tunisia). **Marine Pollution Bulletin**, 64, n. 2, p. 241-251, 2012/02/01/ 2012.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P. *et al.* Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, 22, n. 1, p. 25-34, 1999.

BOMBONATO, M.; ROCHEL, S.; VICENTINI, C.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I. Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinus macrocephalus* = Morphological study of the hepatic tissue of *Leporinus macrocephalus*. **Acta Scientiarum : Biological Sciences**, 29, 11/23 2007.

BOYD, C. E. Reliability of Water Analysis Kits. **Transactions of the American Fisheries Society**, 109, n. 2, p. 239-243, 1980.

BOYD, C. E. **Bottom soils, sediment, and pond aquaculture**. New York: Chapman and Hall, 1995.

BURGEOT, T.; BOCQUÉNÉ, G.; PORTE, C.; DIMEET, J. *et al.* Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. **Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER**, 131, p. 125-141, 02/01 1996.

CAJARAVILLE, M.; BEBIANNO, M.; BLASCO, J.; PORTE, C. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: A practical approach. **The Science of the total environment**, 247, p. 295-311, 04/01 2000.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, 5, p. 327-336, 2007.

CARDOSO, A. G. A.; BOAVENTURA, G. R.; SILVA FILHO, E. V.; BROD, J. A. Metal Distribution in Sediments from the Ribeira Bay, Rio de Janeiro - Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 12, p. 767-774, 2001.

CARVALHO-NETA, R.; SOUSA, D.; ALMEIDA, Z.; SANTOS, D. *et al.* Histopathological and biometric comparison between catfish (Pisces Ariidae) from a harbor and a protected area Brazil. **Aquatic Biosystems**, 10/01 2014.

CHANG, B. V.; LIU, W. G.; YUAN, S. Y. Microbial dechlorination of three PCB congeners in river sediment. **Chemosphere**, 45, n. 6, p. 849-856, 2001/11/01/ 2001.

COSTA, H. **Uma avaliação da qualidade das águas costeiras do estado do Rio de Janeiro.** Fundação de Estudos do Mar, 1998. 9788585966102.

CRUZ, A.; PRADO, T.; AGUILAR, L.; DAVID COUTO, R. Environmental effects on the gills and blood of *Oreochromis niloticus* exposed to rivers of Bahia, Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 111, 01/31 2015.

CRUZ, C.; SILVIA, P.; LIA, S.; ADILSON, F. *et al.* Sensitivity, ecotoxicity and histopathological effects on neotropical fish exposed to glyphosate alone and associated to surfactant. **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**, 8, p. 25-33, 03/31 2016.

DAY, J.; HALL, C.; KEMP, W. M.; YÁÑEZ-ARANCIBIA, A. Estuarine Ecology. **XF2006300188**, 13, 03/01 1990.

DELBEEK, J. C.; WILLIAMS, D. D. Morphological differences among females of four species of stickleback (Gasterosteidae) from New Brunswick and their possible ecological significance. **Canadian Journal of Zoology**, 65, n. 2, p. 289-295, 1987/02/01 1987.

DER, O. R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review, *Environ. Toxicol. Pharmacol*, 13, p. 57-149, 01/01 2003.

DHN. Carta Náutica nº1633 = Baía de Paraty e adjacências. NAVEGAÇÃO, D. d. H. e.: Marinha do Brasil 2000.

DÍAZ, A.; GARCÍA, A.; DEVINCENTI, C.; GOLDEMBERG, A. L. Ultrastructure and Histochemical Study of Glycoconjugates in the Gills of the White Croaker (*Micropogonias furnieri*). **Anatomia, histologia, embryologia**, 34, p. 117-122, 05/01 2005.

DÍAZ, A.; GARCIA, A. M.; GOLDEMBERG, A. L. Glycoconjugates in the branchial mucons cells of *Cynoscion guatucupa* (Cuvier, 1830) (Pisces: Sciaenidae). **Scientia Marina**, 69, p. 545-553, 12/01 2005.

DÍAZ, A.; M GARCÍA, A.; DEVINCENTI, C.; GOLDEMBERG, A. L. **Mucous Cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and Ultrastructure**. 2001. 135-139 p.

DILLON, P. J.; KIRCHNER, W. B. The effects of geology and land use on the export of phosphorus from watersheds. **Water Research**, 9, n. 2, p. 135-148, 1975/02/01/ 1975.

DUTTA, H. M.; DATTA-MUSHI, J. S. **Fish Morphology**. Taylor & Francis, 1996. 9789054102892.

EIRAS-STOFELLA, D. R. **Variabilidade morfológica da região faríngea dos arcos branquiais de algumas espécies de peixes (Teleostei), estudadas através da microscopia eletrônica de varredura**. 1994. PhD Thesis -, Universidade Federal do Paraná.

EL BAKARY, N.; EL-GAMMAL, H. L. Comparative histological, histochemical and ultrastructural studies on the liver of flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) and sea bream (*Sparus aurata*). **Global Veterinaria**, 4, p. 548-553, 01/01 2010.

ELSHAER, F.; M ELSHAER, F.; ALLAH, H.; BAKRY, S. **Histopathological Alterations in Gills of Some Poeciliid Fishes after Exposure to Bisphenol A**. 2015.

EVANS, D. H.; CLAIBORNE, J. B. **The Physiology of Fishes, Third Edition**. Taylor & Francis, 2005. 9780849320224.

FACCIOLI, C.; CHEDID, R.; BOMBONATO, M.; VICENTINI, C. *et al.* Morphology and Histochemistry of the Liver of Carnivorous Fish *Hemisorubim platyrhynchos*. **International Journal of Morphology**, 32, p. 715-720, 06/01 2014.

FANTA, E.; RIOS, F.; ROMAO, S.; VIANNA, A. *et al.* Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54, p. 119-130, 03/01 2003.

FATH-ELBAB, M. R. **Fundamentals of the Histology of Fish**. 2nd ed ed. Egyptian Books House: Egypt: 2004.

FEIST, S. W. Atlas of fish histology - Edited by F. Genten, E. Terwinghe and A. Danguy. **Journal of Fish Biology**, 75, n. 3, p. 757-758, 2009.

FERGUSON, H. W.; MORRISON, D.; OSTLAND, V. E.; LUMSDEN, J. *et al.* Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Comparative Pathology**, 106, n. 3, p. 255-265, 1992/04/01/ 1992.

FERREIRA, A.; HORTA, M.; CUNHA, C. Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento, na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, 10, p. 229-241, 06/01 2010.

FIGUEIREDO, M. A. O.; BARRETO, M. B. B.; REIS, R. P. Caracterização das macroalgas nas comunidades marinhas da Área de Proteção Ambiental de Cairuçu, Parati, RJ: subsídios para futuros monitoramentos. **Brazilian Journal of Botany**, 27, p. 11-17, 2004.

FILHO, L.; MAGRINI, A. Desenvolvimento econômico-industrial e o impacto sobre a zona costeira: o caso Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro/Brasil. **Revista Augustus**, 21, 05/09 2017.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. **Brazilian Journal of Biology**, 71, p. 179-188, 2011.

FONSECA, A. R.; SANCHES FERNANDES, L. F.; FONTAINHAS-FERNANDES, A.; MONTEIRO, S. M. *et al.* From catchment to fish: Impact of anthropogenic pressures on gill histopathology. **Science of The Total Environment**, 550, p. 972-986, 2016/04/15/ 2016.

FRANKLIN, C. E. Surface ultrastructural changes in the gills of sockeye salmon (teleostei: *Oncorhynchus nerka*) during seawater transfer: Comparison of successful and unsuccessful seawater adaptation. **Journal of Morphology**, 206, n. 1, p. 13-23, 1990.

FREIRE, M.; GOMES, V.; GINUINO, I.; ARIAS, A. R. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, ISSN 1981-9366, Vol. 12, Nº. 3, 2008 (Ejemplar dedicado a: Monitoramento biológico em ecossistemas aquáticos continentais), 12, 10/01 2008.

FRERET-MEURER, N. V.; ANDREATA, J. V.; MEURER, B. C.; MANZANO, F. V. *et al.* Spatial distribution of metals in sediments of the Ribeira Bay, Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, 60, n. 4, p. 627-629, 2010/04/01/ 2010.

GARCIA SANTOS, S.; MONTEIRO, S.; ROCHA, M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. **Histological alterations in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* caused by cadmium**. 2007. 376-381 p.

GILVEAR, D. J.; PETTS, G. E. Turbidity and suspended solids variations downstream of a regulating reservoir. **Earth Surface Processes and Landforms**, 10, n. 4, p. 363-373, 1985.

GOMES, I. D.; NASCIMENTO, A. A.; SALES, A.; ARAÚJO, F. G. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in freshwater Neotropical systems? **Environmental Monitoring and Assessment**, 184, n. 9, p. 5523-5531, September 01 2012. journal article.

GONZALEZ, G.; CRESPO, S.; BRUSLE, J. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. **Journal of Fish Biology**, 43, p. 363-373, 04/04 2005.

GUSMÃO, E.; RODRIGUES, R.; MOREIRA, C.; ROMANO, L. *et al.* Growth and Histopathological Effects of Chronic Exposition of Marine Pejerrey *Odontesthes argentinensis* Larvae to Petroleum Water-Soluble Fraction (WSF). **Ambio**, 41, p. 456-466, 03/29 2012.

H. JAGOE, C.; A. HAINES, T. **Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts due to addition of acid and aluminum to stream water.** 1997. 137-146 p.

HANDY, R.; EDDY, F.; ROMAIN, G. **In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminium and zinc toxicity.** 1989. 737-747 p.

HANDY, R. D.; PENRICE, W. S. The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, 106, n. 3, p. 717-724, 1993/11/01/ 1993.

HARTLEY, W. R.; THIYAGARAJAH, A.; TREINIES, A. M. Liver lesions in the gar fish (*Lepisosteidae*) as biomarkers of exposure. **Marine Environmental Research**, 42, n. 1, p. 217-221, 1996/06/01/ 1996.

HEATH, A. G. **Water pollution and fish physiology.** Boca Raton: CRC Press, 1995.

HEMMADI, V. **A critical review on integrating multiple fish biomarkers as indicator of heavy metals contamination in aquatic ecosystem.** 2017. 5494 p.

HERMENEAN, A.; DAMACHE, G.; ALBU, P.; ARDELEAN, A. *et al.* Histopathological alterations and oxidative stress in liver and kidney of *Leuciscus cephalus* following exposure to heavy metals in the Tur River, North Western Romania. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 119, p. 198-205, 2015/09/01/ 2015.

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E. *et al.* **Histopathologic biomarkers.** 1992.

HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. **Fish Physiology.** Elsevier Science, 1969. 9780080585215.

HUGGETT, R. J. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Anthropogenic Stress.** CRC Press, 2018. 9781351087179.

HUGHES, G. M.; BALLINTIJS, C. M. Electromyography of the Respiratory Muscles and Gill Water Flow in the Dragonet. **Journal of Experimental Biology**, 49, n. 3, p. 583-602, 1968.

HUGHES, G. M.; MUNSHI, J. S. D. Fine structure of the gills of some Indian air-breathing fishes. **Journal of Morphology**, 160, n. 2, p. 169-193, 1979.

INEA. Estudo técnico para criação da área de proteção ambiental do ecossistema marinho da Baía de Sepetiba. INEA: Instituto Estadual do Ambiente: 15 p. 2009.

JARIAL, M. S.; WILKINS, J. H. Structure of the kidney in the coelacanth *Latimeria chalumnae* with reference to osmoregulation. **Journal of Fish Biology**, 76, n. 3, p. 655-668, 2010.

KAPOOR, B. G.; SMIT, H.; VERIGHINA, I. A. The Alimentary Canal and Digestion in Teleosts. *In*: RUSSELL, F. S. e YONGE, M. (Ed.). **Advances in Marine Biology**: Academic Press, 1976. v. 13, p. 109-239.

KARGES, R. G.; WOODWARD, B. Development of lamellar epithelial hyperplasia in gills of pantothenic acid-deficient rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, 25, n. 1, p. 57-62, 1984.

KARLSSON-NORRGREN, L.; BJORKLUND, I.; LJUNGBERG, O.; RUNN, P. Acid water and aluminium exposure; experimentally induced gill lesions in brown trout (*Salmo trutta*). **J. Fish Dis.**, 9, p. 11-25, 1986.

KEHRIG, H. A.; MALM, O.; MOREIRA, I. Mercury in a widely consumed fish *Micropogonias furnieri* (Demarest, 1823) from four main Brazilian estuaries. **Science of The Total Environment**, 213, n. 1, p. 263-271, 1998/06/10/ 1998.

KREISBERG, J. I.; KARNOVSKY, M. J. Glomerular cells in culture. **Kidney International**, 23, n. 3, p. 439-447, 1983/03/01/ 1983.

KUSUM, W.; PRADESH, M. **Using histopathology of fish as a protocol in the assessment of aquatic pollution.** 2013.

LACERDA, L.; WC, P.; M, F. Níveis de metais pesados em sedimentos marinhos da Baía da Ribeira, Angra dos Reis. **Ciência e cultura**, 34, p. 921-927, 1982.

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, 46, n. 2, p. 182-186, 2003/02/01/ 2003.

LANG, T.; WOSNIOK, W.; BARŠIENĖ, J.; BROEG, K. *et al.* Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. **Marine Pollution Bulletin**, 53, n. 8, p. 488-496, 2006/01/01/ 2006.

LAURENT, P. 2 Gill Internal Morphology**Financially supported by Grant CNRS AI 03 4302. *In: HOAR, W. S. e RANDALL, D. J. (Ed.). Fish Physiology: Academic Press, 1984. v. 10, p. 73-183.*

LAURENT, P.; DUNEL, S. Morphology of gill epithelia in fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 238, n. 3, p. R147-R159, 1980.

LEDY, K.; GIAMBÉRINI, L.; PIHAN, J.-C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta fario* in acidic, aluminium-containing stream water. **Diseases of aquatic organisms**, 56, p. 235-240, 11/01 2003.

LEKNES, I. An improved method to demonstrate macrophages in teleosts. **Tissue and Cell**, 47, 02/01 2015.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, R. C. L.; MELO, D. C. Stress in fishes. **Rev. Bras. Rep. Anim**, 30, p. 113-117, 2006.

LINS, J.; KIRSCHNIK, P.; QUEIROZ, V.; CIRIO, S. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista Acadêmica. Ciências Agrárias and Ambientais*, 8, p. 469-484, 01/01 2010.

MALLATT, J. **Fish Gill Structural Changes Induced by Toxicants and Other Irritants: A Statistical Review**. 1985. 630-648 p.

MARTINEZ, C. B. R.; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, 64, p. 797-807, 2004.

MC CAHON, C. P.; PASCOE, D.; MC KAVANAGH, C. Histochemical observations on the salmonids *Salmo salar* L. and *Salmo trutta* L. and the ephemeropterans *Baetis rhodani* (Pict.) and *Ecdyonurus venosus* (Fabr.) following a simulated episode of acidity in an upland stream. **Hydrobiologia**, 153, n. 1, p. 3-12, October 01 1987. journal article.

MCCONNELL, R. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais Vol. 03**. Edusp, 1999. 9788531404931.

MENEZES, N. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5)**. 2000.

MOKHTAR, D. **Fish Histology From Cells to Organs**. 2017. 9781771885898.

MOLISANI, M. M.; MARINS, R.; MACHADO, W.; PARAQUETTI, H. H. M. *et al.* Environmental changes in Sepetiba Bay, SE Brazil. **Regional Environmental Change**, 4, p. 17-27, 03/01 2004.

MÖLLER, H.; ANDERS, K. **Diseases and parasites of marine fishes**. Kiel: Möller, 1986. 3923890044 9783923890040.

MORON, S.; ANDRADE, C.; FERNANDES, M. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. **Neotropical Ichthyology - NEOTROP ICHTHYOL**, 7, 09/01 2009.

MORRISON, J. **Fish Histology and Histopathology**. US Fish and Wildlife Service's National Conservation Training Center Web Site: 2007.

MOVAHEDINIA, A.; BEHROOZ, A.; MAHMOOD, B. Gill histopathological lesions of the sturgeons. **Asian Journal of Animal and Veterinary Advances**, 7, p. 710-717, 2012.

NININ, A. P. D. S. **Morfologia e distribuição de peixes da família Sciaenidae no estágio de transformação na costa sul e sudeste do Brasil**. 2008. - Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/21/21131/tde-29062009-160750/>.

NORENA-BARROSO, E.; ALVAREZ, R.; GOLD-BOUCHOT, G.; ZAPATA-PÉREZ, O. Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. **Marine pollution bulletin**, 48, p. 263-269, 03/01 2004.

OGAWA, M. Comparative study on the external shape of the teleostean kidney with relation to phylogeny. **Science Reports of the Tokyo Kyoiku Daigaku Section B**, 10, n. 149, p.???, 1961/03 1961.

OGUZ, A. A histological study of the kidney structure of Van fish (*Alburnus tarichi*) acclimated to highly alkaline water and freshwater. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, 48, 01/30 2015.

OJEDA, J. L.; ICARDO, J. M.; WONG, W. P.; IP, Y. K. Microanatomy and ultrastructure of the kidney of the African lungfish *Protopterus dolloi*. **The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, 288A, n. 6, p. 609-625, 2006.

OLSON, K. R.; FROMM, P. O. A scanning electron microscopic study of secondary lamellae and chloride cells of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, 143, n. 4, p. 439-449, December 01 1973. journal article.

OSTRANDER, G. K. Preface. *In*: OSTRANDER, G. K. (Ed.). **The Laboratory Fish**. London: Academic Press, 2000. p. xix.

PACHECO, M.; MONTEIRO SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, 53, p. 331-347, 12/01 2002.

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, 50, p. 109-124, 09/01 2000.

PERRY, S. F. THE CHLORIDE CELL: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, 59, n. 1, p. 325-347, 1997.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. *In*: RANKIN, J. C. e JENSEN, F. B. (Ed.). **Fish Ecophysiology**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1993. p. 231-264.

PESSANHA, A. L. M.; ARAÚJO, F. G.; AZEVEDO, M. C. C. D.; GOMES, I. D. Variações temporais e espaciais na composição e estrutura da comunidade de peixes jovens da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Zoologia**, 17, p. 251-261, 2000.

PIZZOCHERO, A.; TORRE, A.; SANZ, P.; NAVARRO, I. *et al.* Occurrence of legacy and emerging organic pollutants in whitemouth croakers from Southeastern Brazil. **Science of The Total Environment**, 05/01 2019.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. **Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution**. 1994. 339-352 p.

PRASHANT, J.; ABDSALAM, A.; KHALIFA, N. Assesment of dissolved oxygen in coastal waters of Benghazi, Libya. 15, p. 135-156, 01/01 2009.

PRONINA, S.; MARINA, B.; PRONIN, N. Characteristics of Melanomacrophage Centers in the Liver and Spleen of the Roach *Rutilus rutilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Lake Kotokel during the Haff Disease Outbreak. **Journal of Ichthyology**, 54, p. 104-110, 01/03 2014.

RAJAMANICKAM, V.; NARAYANAN, M. **Heavy Metal Induced Histopathological Alterations in Selected Organs of the *Cyprinus carpio* L.(Common Carp)**. 2009.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 9780891163824.

REIMSCHUESSEL, R. A Fish Model of Renal Regeneration and Development. **ILAR Journal**, 42, n. 4, p. 285-291, 2001.

REINERT, R. E. Biological Indicators of Stress in Fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, 121, n. 2, p. 274-276, 1992/03/01 1992.

RIBEIRO, C.; BELGER, L.; PELLETIER, E.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental research**, 90, p. 217-225, 12/01 2002.

- RIBEIRO, C. A. D. O.; KATSUMITI, A.; FRANÇA, P.; MASCHIO, J. *et al.* Biomarkers responses in fish (*Atherinella brasiliensis*) of paranaguá bay, southern Brazil, for assessment of pollutant effects. **Brazilian Journal of Oceanography**, 61, p. 1-11, 2013.
- ROBERTS, R. J. **Fish Pathology**. W. B. Saunders, 1978. 9780721607948.
- RODRIGUES, E.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revista Brasileira De Zoologia - REV BRAS ZOOL**, 15, 01/01 1998.
- ROGERS, D. F. Physiology of Airway Mucus Secretion and Pathophysiology of Hypersecretion. **Respiratory Care**, 52, n. 9, p. 1134-1149, 2007.
- ROMBOUGH, P. The functional ontogeny of the teleost gill: Which comes first, gas or ion exchange? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 148, n. 4, p. 732-742, 2007/12/01/ 2007.
- ROMER, A. S.; PARSONS, T. S. **Anatomia Comparada dos Vertebrados**. São Paulo: 1985.
- RONDINELI, G. R.; BRAGA, F.; TUTUI, S.; BASTOS, G. Dieta de *Menticirrhus americanus* (Linnaeus, 1758) e *Cynoscion jamaicensis* (Vaillant & Bocourt, 1883) (Pisces, Sciaenidae) no sudeste do Brasil, Estado de Sao Paulo. **Bol. Inst. Pesca**, 33, p. 221-228, 10/08 2019.
- SABOIA-MORAES, S.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J.; MOTA, D.; BITTENCOURT, A. Mucous cell type in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. **Journal of Fish Biology**, 49, p. 545-548, 04/01 2005.
- SALES, C. F.; SANTOS, K. P. E. D.; RIZZO, E.; RIBEIRO, R. I. M. D. A. *et al.* Proliferation, survival and cell death in fish gills remodeling: From injury to recovery. **Fish & Shellfish Immunology**, 68, p. 10-18, 2017/09/01/ 2017.
- SAMANIDOU, V.; PAPADOYANNIS, I.; VASILIKIOTIS, G. Vertical distribution of heavy metals in sediments from rivers in northern Greece. **Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology**, 26, n. 8, p. 1345-1361, 1991/12/01 1991.
- SANTANA, T.; TEIXEIRA, E.; CASTRO, J.; FERNANDES, J. *et al.* Principais espécies de Sciaenidae marinhas e estuarinas comercializadas na Ilha do Maranhão. *In*, 2016. p. 41-52.
- SANTOS, T.; GOMES, V.; JOSÉ, M.; PASSOS, A. *et al.* Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene. **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, 6, p. 109-120, 01/01 2011.
- SAWYER, W. H.; UCHIYAMA, M.; PANG, P. K. Control of renal functions in lungfishes. **Federation proceedings**, 41, n. 8, p. 2361-2364, 1982/06// 1982.

SCHLENK, D.; BENSON, W. **Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts: Volume 2 - Systems.** 2001.

SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M. *et al.* The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6, n. 1, p. 75-86, March 01 1997. journal article.

SHEPHARD, K. L. The Influence of Mucus on the Diffusion of Ions across the Esophagus of Fish. **Physiological Zoology**, 55, n. 1, p. 23-34, 1982.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 69, n. 1, p. 112-120, 2008/01/01/ 2008.

SKIDMORE, J. F.; TOVELL, P. W. A. **Toxic effects of zinc sulphate on the gills of rainbow trout.** 1972.

SKINNER, L.; RIZZO, A.; PEDRINI, A.; BREVES, A. *et al.* **Biodiversidade da Baía da Ilha Grande: integrando pesquisa e divulgação científica.** 2016.

SLANINOVA, A.; MÁCHOVÁ, J.; SVOBODOVA, Z. Fish kill caused by aluminium and iron contamination in a natural pond used for fish rearing: A case report. **Veterinární medicína**, 59, p. 573-581, 01/01 2014.

SOLLID, J.; NILSSON, G. E. Plasticity of respiratory structures — Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, 154, n. 1, p. 241-251, 2006/11/01/ 2006.

STEHR, C. M.; JOHNSON, L. L.; MYERS, M. S. Hydropicvacuolation in liver of three species of fish from the U. S. West Coast: lesion description and risk assessment associated with contaminant exposure. **Dis aquat Org**, 32, p. 119-135, 1998.

STRZYŻEWSKA, E.; SZAREK, J.; BABINSKA, I. Morphologic evaluation of the gills as a tool in the diagnostics of pathological conditions in fish and pollution in the aquatic environment: A review. **Veterinární Medicína**, 61, p. 123-132, 03/17 2016.

SUNITA, C.; BANERJEE, T. K. Histopathological analysis of the respiratory organs of *Channa striata* subjected to air-exposure. **Veterinarski Arhiv**, 74, p. 37-52., 01/01 2004.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features.** Kodansha Limited, 1995. 9783437307829.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P. *et al.* Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 121, n. 3, p. 307-320, 2003/03/01/ 2003.

ULTSCH, G. R.; GROS, G. Mucus as a diffusion barrier to oxygen: Possible role in O₂ uptake at low pH in carp (*Cyprinus carpio*) gills. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology**, 62, n. 3, p. 685-689, 1979/01/01/ 1979.

USHIKI, T. Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint. **Archives of histology and cytology**, 65, p. 109-126, 07/01 2002.

VAL, A. L.; AMAZÔNIA, I. N. D. P. D. **Biology of Tropical Fishes**. INPA, 1999. 9788521100324.

VAN DYK, J. C.; PIETERSE, G. M.; VAN VUREN, J. H. J. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 66, n. 3, p. 432-440, 2007/03/01/ 2007.

VARIACHAK, T. Studies on endothelial cells in the liver of fishes. **Z. Zetlforsch. mikrosk. Ant**, 27, p. 46-51, 1938.

VAZZOLER, G. Distribuição da fauna de peixes demersais e ecologia dos Sciaenidae da plataforma continental brasileira, entre as latitudes 29°21'S (Tôrres) e 33°41'S (Chuí). **Boletim do Instituto Oceanográfico**, 24, p. 85-169, 1975.

VEIGA, M. L. D.; RODRIGUES, E. D. L.; PACHECO, F. J.; RANZANI-PAIVA, M. J. T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of Trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 45, p. 171-175, 2002.

VELKOVA-JORDANOSKA, L.; KOSTOSKI, G. Histopathological analysis of liver in fish (*Barbus meridionalis petenyi* Heckel) in reservoir Trebeništa. **Natura Croatica**, 14, 06/30 2005.

VICENTINI, C.; FRANCESCHINI-VICENTINI, I.; BOMBONATO, M. T. S.; BERTOLUCCI, B. *et al.* Morphological study of the liver in the teleost *Oreochromis niloticus*. **Int. J. Morphol.**, 23, p. 211-216, 01/01 2005.

WANI, A.; SIKDAR-BAR, M.; BORANA, K.; KHAN, H. A. *et al.* **Histopathological alterations induced in gill epithelium of African catfish, *Clarias gariepinus*, exposed to copper sulphate.** 2011. 278-282 p.

WANICK, R.; KUTTER, V.; TEIXEIRA, C.; CORDEIRO, R. *et al.* Use of digestive gland of the oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) as a bioindicator of Zn, Cd and Cu contamination in estuarine sediments (south-east Brazil). **Chemistry and Ecology**, 28: 1-9p. doi: 10/1080/02757540.2011.638630

WARGA, R. M.; NUSSLEIN-VOLHARD, C. Origin and development of the zebrafish endoderm. **Development** 126, 827-838p 1999.

- WASSERMAN, J. C.; FIGUEIREDO, A. M. G.; PELLEGATTI, F.; SILVA-FILHO, E. V. Elemental composition of sediment cores from a mangrove environment using neutron activation analysis. **Journal of Geochemical Exploration**, 72, n. 2, p. 129-146, 2001/05/01/ 2001.
- WEGNER, N. C.; SEPULVEDA, C. A.; AALBERS, S. A.; GRAHAM, J. B. Structural adaptations for ram ventilation: Gill fusions in scombrids and billfishes. **Journal of Morphology**, 274, n. 1, p. 108-120, 2012. <https://doi.org/10.1002/jmor.20082>
- WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; VETHAAK, A. D.; GRINWIS, G. C. M. *et al.* Aquatic toxicology:: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11, n. 3, p. 289-295, 2002/07/01/ 2002.
- WHITEAR, M.; MITTAL, A. **Surface secretions of the skin of Blennius (Lipophrys) pholis L.** 2006. 317-331 p.
- WILSON, J.; LAURENT, P.; TUFTS, B.; BENOS, D. *et al.* NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: An immunological approach to ion-transport protein localization. **J.exp.Biol.**, 203, 08/01 2000.
- WITHERS, P. C. **Comparative Animal Physiology.** Saunders College Pub., 1992. 9780030128479.
- WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates: A review. **Annual Review of Fish Diseases**, 2, p. 91-108, 1992/01/01/ 1992.
- WOLKE, R. E.; MURCHELANO, R. A.; DICKSTEIN, C. D.; GEORGE, C. J. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 35, n. 1, p. 222-227, 1985/07/01 1985.
- WOOD, C. 1. Toxic responses of the gill. *In*, 2001. p. 11-99.
- WOOD, E. M.; YASUTAKE, W. T. Histopathology of kidney disease in fish. **The American journal of pathology**, 32, n. 4, p. 845-857, Jul-Aug 1956.
- YANG, C. Z.; ALBRIGHT, L. J. Effects of the harmful diatom *Chaetoceros concavicornis* on respiration of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Dis aquat Org**, 14, p. 105-114, 1992.
- ZACCONE, G.; SALVATORE, F.; AINIS, L.; CONTINI, A. **Localization of calmodulin positive immunoreactivity in the surface epidermis of the brown trout, Salmo trutta.** 1989. 13-16 p.
- ZADUNAISKY, J. A. Chloride cells and osmoregulation. **Kidney International**, 49, n. 6, p. 1563-1567, 1996/06/01/ 1996.

ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J. *et al.* Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, 606, n. 2, p. 135-150, 2008/01/14/ 2008.

ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J. C.; FERRER, C. The Melanogenic System of *Xenopus laevis*. **Archives of histology and cytology**, 61, p. 305-316, 11/01 1998.

12. ARTIGOS PUBLICADOS

ASSIS DE BRITO, T.L.; NASCIMENTO, A. A.; GONÇALVES, C. F. DOS SANTOS; DOS SANTOS, M. A. J. ; Sales, A. Assessing the histological changes in fish gills as environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 48, p. 590-601, 2020.

Latin American Journal of Aquatic Research, 48(4): 590-601, 2020
DOI: 10.3856/vol48-issue4-fulltext-2351

Research Article

Assessing the histological changes in fish gills as environmental bioindicators in Paraty and Sepetiba bays in Rio de Janeiro, Brazil

Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho¹, Aparecida Alves do Nascimento²
Caio Fábio dos Santos Gonçalves³ Marcos Antônio José dos Santos² & Armando Sales²
¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Seropédica, RJ, Brazil
²Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Biologia Animal, Área de Histologia e Embriologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil
³Discente do curso de Medicina Veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro Seropédica, Brazil, RJ, Brazil
Corresponding author: Thatiana L. Assis (thati.lu@yahoo.com.br)



ASSIS DE BRITO, T.L.; NASCIMENTO, A.A. ; GOMES, I. D.; ARAÚJO, F. G. Histological changes in fish hepatopancreas and kidney as indicators of environmental quality in tropical bays. **Environmental Biology of Fishes**, v. 105, p. 917-931, 2022.

Environ Biol Fish
<https://doi.org/10.1007/s10641-022-01300-1>



Histological changes in fish hepatopancreas and kidney as indicators of environmental quality in tropical bays

Thatiana Luiza Assis de Brito Carvalho ·
Aparecida Alves do Nascimento ·
Iracema David Gomes · Francisco Gerson Araújo

Received: 3 January 2022 / Accepted: 27 June 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022