

**Alfonso Braga Bartolini Salimbeni Vivai**

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

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

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

Versão Original.

São Paulo  
2011

## RESUMO

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

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

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

## ABSTRACT

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

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

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

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Antártida

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

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

## 1.2 Área de Estudo

A estação Brasileira “Comandante Ferraz” (62°05’00” S, 58°23’28”W) está instalada na Península Keller, margeando a Enseada Martel, na Baía do Almirantado, Ilha do Rei George. Essa ilha é a maior ilha do arquipélago Shetlands do Sul (South Shetlands), localizando-se no lado ocidental da Península Antártica. A denominação “Área Antártica Especialmente Gerenciada” refere-se às áreas de proteção histórica e ambiental abrangendo também o ambiente marinho. Essa denominação se aplica à Baía do Almirantado, recebendo grande interesse pelo seu ecossistema que apresenta grande variação ambiental quanto à cobertura de gelo marinho e terrestre e das condições climáticas.

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

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

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

As partes do Tratado resolvem que a liberdade de pesquisa é assegurada, com os seus resultados postos em livre circulação e cambiável entre os países; observando-se a natureza pacífica a que se destinam as atividades naquele continente, há a possibilidade de desembarque de massa humana militar e seus equipamentos, desde que o objetivo seja pesquisa pacífica ou outro objetivo de caráter pacífico; a área de jurisdição do Tratado situa-se ao sul de sessenta graus de latitude sul, inclu-

indo plataformas de gelo, mas sem que seja violado o direito internacional aplicável ao alto-mar; e o mais importante num mundo atômico, a realização de explosões nucleares e o depósito de resíduos radioativos é proibida.

### 1.3 Geologia

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

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

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

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

### 1.4 Ictiofauna

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

Não existem registros fósseis dos nototeniídeos, mas foram encontrados fósseis de peixes taxonomicamente diversos nos depósitos antárticos formados, aproximadamente, ao mesmo tempo em que os nototeniídeos emergiram. Contudo, esses peixes não estão intimamente relacionados aos nototeniídeos e também não são encontrados entre a fauna recente. Os três principais fatores – baixa temperatura, habitat limitado e considerações tróficas – tidos como responsáveis pelas mudanças na ictiofauna ou pela limitada diversidade na região antártica, ainda são bastante discutidos (EASTMAN; GRANDE, 1989).

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

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

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

### **1.5 Ordem Perciforme. Subordem Notothenioidei.**

Os nototeniídeos recentes são peixes de fundo e vivem a até 1000 metros de profundidade. Sem competição e com isolamento garantido, houve a oportunidade de especiação intra-específica (dentro do próprio grupo). Tendo 101 espécies conhecidas, as famílias mais expressivas são a Nototheniidae e a Channichthyidae (RODRIGUES et al., 2011). Os peixes nototeniídeos preenchem nichos ecológicos

normalmente ocupados por peixes de diversos grupos em regiões temperadas. Isso é corroborado por Eastman (1993), que descreve esses peixes como tendo representantes de nove tipos ecológicos:

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

De acordo com Eastman e DeVries (1982), o *Trematomus newnesi* é um peixe do grupo 4<sup>1</sup>.

## 1.6 Trematomus

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

---

<sup>1</sup>**Criopelágico e semipelágico:** embora “criopelágico” seja a definição mais comum para esse peixe, por ser encontrado se alimentando logo abaixo das placas de gelo ou mesmo na superfície inferior destas, Eastman e DeVries o descrevem como tendo bastante plasticidade trófica: este fato leva-os a enquadrá-lo também no grupo 6 – semipelágico.

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

A ecologia deste peixe é pouco estudada, se comparada aos outros gêneros da mesma família como, por exemplo, a *Notothenia cooriceps*. Uma das maneiras de se ver uma provável grande diferença de ecologia entre esses peixes se comparada à de outros peixes teleósteos mais estudados, por exemplo, os tropicais, é a falta de uma peça anatômica apontada por taxonomistas como grande divisora entre dois grandes grupos gerais de peixes (ósseos e cartilagosos): a bexiga natatória. Alguns estudos de flutuabilidade têm apontado o baixo peso desses peixes como uma provável resposta à falta desta estrutura para sua capacidade de flutuação, uma vez que o *Trematomus newnesi* venha a ser classificado como um peixe semipelágico (se mantém parte de sua vida no substrato, embora se alimente na coluna d'água até mesmo na superfície inferior da placa/plataforma de gelo antártica). E mesmo entre as espécies do gênero *Trematomus* há diferença em sua classificação: os peixes *T. bernachii* Boulenger e *T. centronotus* Regan, por exemplo, são considerados espécies bênticas típicas, passando mais tempo no substrato oceânico do que na coluna d'água; estas espécies têm adaptabilidades morfológicas para este modo de vida: corpos achatados e especializações de contato com o substrato (EASTMAN; DEVRIES, 1982).

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

### **1.7 Metabolismo dos organismos polares**

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

Essa habilidade única de evitar congelar decorre de múltiplos mecanismos de resistência ao congelamento. Quando acontece a produção de calor fisiológico e a conservação do mesmo - é o caso de animais homeotermos, como baleias, focas e pingüins. Um segundo mecanismo de resistência é comportamental, onde um animal procura um local menos frio. O *super-resfriamento*, outro mecanismo bastante eficaz, consiste na idéia de que a água seja extremamente fria e os organismos que nela estão presentes não congelam. Se pensar outros organismos que não a maioria dos peixes, como pequenos invertebrados, têm crioprotetores como sorbitol e/ou glicerol, tolerando congelamentos sem restrições. Paralelamente a esses mecanismos, a físico-química do animal ajuda na árdua tarefa de mantê-lo protegido do congelamento, onde o organismo pode regular a quantidade de sal em relação ao da água do mar (isosmóticos ou hiperosmóticos), ou com a produção de uma glicoproteína (estabilizador), causando o momento de *super-resfriamento* (CLARKE, 1983).

A maioria dos experimentos realizados tratando das atividades enzimáticas têm sido efetuadas apenas em organismos euritermais, mais freqüentemente em peixes aclimatados em laboratório. O problema, no entanto, é que a maneira como os peixes euritermais lidam com o curto período de mudanças de temperatura é, muito possivelmente, diferente das mudanças envolvidas na adaptação evolucionária (CLARKE, 1983). Algumas espécies acumulam lipídios (triacilglicerol). Essa substância pode ser utilizada como energia reserva. Algumas classes de glicoproteínas podem ser utilizadas como agente adicional de anticongelamento<sup>2</sup>.

Esses dados advêm de uma discussão anterior proposta por trabalhos pioneiros datados da metade do século XX, que procuraram compreender as estratégias adaptativas apresentadas por organismos polares às baixas temperaturas. Com isso, foi elaborada, por Scholander et al., em 1953, a teoria da "Adaptação Metabólica ao Frio", que posteriormente foi endossada por Wohlschalg em 1964 (e posteriormente Opalinski, em 1979). Essa teoria explana que os organismos pecilotérmicos marinhos polares têm taxas metabólicas mais altas do que seria esperado quando da extrapolação de dados obtidos com espécies de hábitos parecidos de regiões

---

<sup>2</sup> **AFGP**: A mudança molecular mais importante na evolução adaptativa de peixes antárticos foi a glicoproteína anticongelante (anti-freeze glicoprotein - AFGP) nos fluidos biológicos (5 a 14 milhões de anos atrás). Rodrigues et al., 2011.

temperadas para as temperaturas polares. No entanto, há diferentes trabalhos que questionam essa teoria, como aponta Clarke (1991).

### **1.8 Xenobióticos, água e a poluição petrolífera**

A poluição dos meios aquáticos acontece em um ritmo mais veloz do que a poluição atmosférica, pois além do número de compostos lançados nas águas ser muito maior que os poluentes encontrados no ar, em determinados meios aquáticos a capacidade de dispersão pode ser muito reduzida. Além disso, a ação conjunta de vários poluentes em determinadas características físicas da água, tais como pH e temperatura, podem potencializar ainda mais os efeitos tóxicos dos poluentes. (PHILLIPS, 1977; HELLAWELL, 1988).

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

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

Apesar dos significativos avanços e melhorias implementados nas atividades de exploração, transporte e armazenamento de petróleo, a frequência de acidentes

ainda é relevante. A cada ano, cerca de 2,5 milhões de toneladas são lançadas no oceano (ETKIN,1998)

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

Os hidrocarbonetos aromáticos caracterizam-se por apresentar anéis benzênicos contendo seis átomos de carbono, arranjados em um ciclo com três duplas ligações alternadas. O benzeno é o mais simples dos aromáticos e a grande maioria das substâncias que pertencem a esta classe deriva desse composto, relativamente solúvel em água, presente em quase todos os tipos de petróleo e nos seus derivados. Tais contaminantes são geralmente acumulados em altas concentrações em tecidos biológicos, pois as taxas de assimilação podem exceder as taxas de metabolização e eliminação. Em vertebrados, por exemplo, a metabolização e a eliminação, podem superar a taxa de assimilação, acarretando em uma acumulação mínima. Porém o acúmulo ao longo da cadeia alimentar pode anular facilmente a eliminação de determinados contaminantes.

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

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

Segundo Livingstone (1993) os biomarcadores podem ser fluídos corpóreos, as células ou os tecidos que indicam, em termos bioquímicos ou celulares, a presença de contaminantes e que permitem inferir o grau de contaminação. Também são consideradas como biomarcadores as respostas fisiológicas, comportamentais ou ener-

géticas dos organismos expostos. Existem assim biomarcadores moleculares, celulares ou sistêmicos, sendo alguns deles específicos para determinados poluentes.

### 1.9 Biomarcadores

Alterações biológicas mensuráveis que evidenciem a exposição dos organismos a um poluente são denominadas biomarcadores de exposição, tais como a atividade de enzimas antioxidantes e a concentração de metalotioneínas<sup>3</sup>. Por sua vez, os biomarcadores de efeito são aqueles que caracterizam um efeito tóxico decorrente do contato de um organismo ao poluente, tal como a peroxidação de lipídios ou o dano de DNA (JESUS; CARVALHO, 2008).

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

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

---

<sup>3</sup> **Biologia Molecular:** Biomarcadores bioquímicos de peixes têm sido usados para avaliar o impacto de poluentes no ambiente e na recuperação de meio ambientes. Por exemplo, informação enzimática na L-arginina, xenobióticos e defesa antioxidante. (Rodrigues et al., 2011)

### **1.10 Micronúcleos e anomalias eritrocitárias.**

Dentre as técnicas citogenéticas atuais, o teste micronúcleo é um método relativamente simples utilizado para detectar o efeito genotóxico de compostos químicos. Micronúcleos são massas intracitoplasmáticas de cromatina com a aparência de um pequeno núcleo, que surgem de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros deixados para trás no estágio de anáfase da divisão celular (FENECH et al., 1999). A frequência de células micronucleadas tem servido como índice de quebras cromossômicas e disfunções no aparato mitótico por mais de 20 anos, e apresenta vantagens como simplicidade, confiabilidade e sensibilidade (AYLLON; GARCIA-VAZQUEZ, 2000), além de baixo custo e rapidez.

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

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

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

### 1.11 Índice de alterações histológicas (IAH)

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

A resposta às diferentes concentrações de poluentes pelas células costuma ser mais rápida do que aquelas apresentadas pelos processos fisiológicos (SASTRY; MILLER, 1981; BERNET et al, 1999; FERNANDES E MAZON, 2003; FRACÁCIO et al., 2003; AKAISHI et al., 2004), tornando o processo histológico uma ferramenta com respostas muitas vezes de horas ou dias; o monitoramento histológico tem uma sensibilidade maior do que os métodos mais clássicos de toxicologia (WESTER et al., 2002), uma vez que efeitos em nível histológico podem ser vistos em dosagens muito mais baixas do que aquelas necessárias para os testes que trabalham com “end points”; e as análises histológicas podem facilitar a identificação do grau de degradação ambiental, quando alterações estruturais podem ser observadas em animais amostrados diretamente do ambiente (FRACÁCIO et al., 2003). Förlin et al. (1986) também salientam a necessidade da utilização de parâmetros de resposta semelhantes tanto em laboratório como no campo, para uma melhor análise dos efeitos tóxicos subletais em populações naturais.

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

Células de bastonetes ou *rodlet cells* - em inglês (RCs) - são células encontradas freqüentemente em teleósteos marinhos e dulcícolas (REITE, 2005; MANERA; ; DEZFULI, 2004), cuja função e origem permanecem desconhecidas. Aparentemente não estão presentes em todos os peixes teleósteos. Sua primeira descrição foi feita por Thelohan em 1892 apud Schmachtenberg<sup>4</sup> (2007), que pensou serem estas células esporozoários Apicomplexa parasita dos peixes; em 1895 essas estruturas receberam a denominação *Rhabdospora telohani*, por Laguesse apud Schmachtenberg<sup>5</sup>(2007), em 1895. Plehn, refutando tal hipótese em 1906 apud Schmachten-

<sup>4</sup> THELOHAN P. Sur des sporozoaires indetermines parasites des poissons. **Journal d'Anatomie et Physiologie Paris (France)**, v. 28, p. 163-171, 1892.

<sup>5</sup> LAGUESSE, E. Sur le pancreas du Crenilabre et particulierement sur le pancreas intra-hepatique. **Revue de Biologie Nord**, v. 7, p. 343-363, 1895.

berg<sup>6</sup> (2007), propõem que as RCs seriam células de defesa com grânulos tendo ação endógena. Ao longo do século XX, e até o momento, ambas as hipóteses foram mantidas, uma vez que ainda não se chegou a um consenso, sendo que há debates entre os autores sobre homologias de suas estruturas típicas, homologias essas que poderiam ser indicativas de sua origem (SCHMASCHTEMBERG, 2007).

As RCs foram observadas em muitos órgãos e porções (brânquias – MAZON et al., 2007/ BARBER et al., 1979/ LEINO, 1982/ DEZFULI et al., 2003; rim cefálico – MAZON et al., 2007; rim – FISHELSON; BECKER, 1999; timo – SIDERITS; BIELEK, 2009; ducto biliar – DEZFULI et al., 2000; intestino – MAZON et al., 2007) de diversos teleósteos marinhos e dulcícolas, com diferentes morfologias em cada espécie. As hipóteses acerca de sua origem endógena afirmam que as RCs são de origem epitelial.

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

Como o mesmo autor claramente expõe, “como a evolução natural é essencialmente conservativa e o número de tipos de células de vertebrados está limitada a cerca de duzentas, é difícil explicar porque um único tipo celular deveria aparecer em teleósteos e estar ausente de todos os “vertebrados superiores”<sup>7</sup>”.

---

<sup>6</sup> PLEHN, M. Ueber eingetuemliche Druesenzellen im Gefaessystem und in aderen Organen bei Fischen. **Anatomischer Anzeiger**, v. 28, p.192-203, 1906.

<sup>7</sup> **Vertebrados superiores**: Embora este seja um termo bastante utilizado para a designação dos representantes do subfilo vertebrata com classificação taxonômica posterior (em nível de complexi-

Estudos ultraestruturais têm mostrado que os bastonetes (*rodlets*) estão dispostos dentro de compartimentos, chamados *rodlet sacs* (sacos de bastonetes) quando observados ao microscópio eletrônico de transmissão. Os bastonetes aparecem na microscopia eletrônica de transmissão com a porção central elétron densa. Quando da “degranulação” da célula, estudos ultra-estruturais têm demonstrado que os bastonetes inteiros são expulsos pela porção anterior da célula, com seu núcleo possuindo polaridade, a manter-se na parte posterior da célula (KRAMER; POTTER, 2002). Os mesmos autores descreveram as células imaturas tendo formato redondo, e a cápsula que as envolve ainda estão bastante finas neste período. As células maduras aparentam o formato elíptico, com a cápsula que envolve a membrana celular bastante espessa, e com maior número de bastonetes.

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

As RCs foram também estudadas quando da contaminação por parasitas e estresse ambiental. Mazon (2007) observou que quando a carpa é infectada com *Trypanoplasma borreli* as células com bastonetes são observadas em maior quantidade nas brânquias, enquanto que em situação de estresse estas células serão encontradas em maior quantidade no rim cefálico destes animais. Dezfuli (2000) observou a presença destas células quando da infestação em *Phoxinus phoxinus* por um nematódeo. (IGER; ABRAHAM, 1997) expuseram carpas e trutas a um grande número de condições anormais (estressores), incluindo metais pesados e água destilada, verificaram um aumento no número de células de bastonetes na pele destes espécimes.

---

dade) aos peixes teleósteos, esse termo não é consenso entre os estudiosos. Um termo mais apropriado seria a designação inglesa “higher vertebrates”.

Estudos com parasitas helmintos têm demonstrado um intenso aparecimento de RCs descarregando seus bastonetes na região de interface com o parasita, discutindo a migração deste tipo celular para outros órgãos a partir do rim cefálico em caso de infecções (DEZFULI, 1998).

Em se tratando de pesquisas antárticas sobre a problemática ambiental, há certa carência em trabalhos voltados à questão do impacto na microbiota piscívora antártica, uma vez que estudos maiores estão voltados aos macroinvertebrados daquela região. Esta preferência pelo estudo dos invertebrados dá-se pelo seu uso já consagrado em biomonitoração de ambientes próximos a habitações humanas. Não obstante esta carência de estudos em peixes frente à exposição por petróleo, também se descortina a necessidade de busca por biomarcadores para este tipo de poluição, que são bastante esparsas.

## **5 CONCLUSÃO**

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

## REFERÊNCIAS<sup>8</sup>

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

---

<sup>8</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PHAN, V. N.; GOMES, V.; PASSOS, M. J. A. C. R.; USSAMI, K. A.; CAMPOS, D. Y. F.; ROCHA, A. J. S.; PEREIRA, B. A. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Station “Comandante Ferraz”, King George Island. **Polar Biology**, v. 30, p. 209-217, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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