



Universidade de Évora

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento Medicina Veterinária

**Alterações estruturais na membrana basolateral
e células clorídricas das brânquias de lampreia-
marinha (*Petromyzon marinus*, L.) após
exposição à atrazina**

Mestrando: Maria Ana Potes Amaral Machado

Orientadora: Professora Doutora Maria João Marinho
Lança Silva de Almeida

Mestrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2015



Universidade de Évora

Escola de Ciências e Tecnologia

Departamento Medicina Veterinária

**Alterações estruturais na membrana basolateral
e células clorídricas das brânquias de lampreia-
marinha (*Petromyzon marinus*, L.) após
exposição à atrazina**

Mestrando: Maria Ana Potes Amaral Machado

Orientadora: Professora Doutora Maria João Marinho
Lança Silva de Almeida

Mestrado em Medicina Veterinária

Dissertação

Évora, 2015

Agradecimentos

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os intervenientes é somente uma das formas de demonstrar-lhes a minha gratidão.

Agradeço à Professora Doutora Maria João Lança, do Departamento de Zootecnia da Universidade de Évora, o ter aceitado ser minha orientadora, pela sua inestimável disponibilidade e afeição sem as quais este trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço ao Professor Doutor Pedro Raposo de Almeida, do Departamento de Biologia da Universidade de Évora, por me ter incluído na sua equipa de investigação no âmbito do Projeto da FCT (Avaliação do sucesso do recrutamento das principais populações portuguesas de *P. marinus* por biotransformação, marcadores de *stress* e transporte iónico em juvenis na fase de migração trófica, PTDC/BIA-BEC/103258/2008) no qual este trabalho se inseriu. Agradeço não só a confiança que em mim depositou mas também o sentido de responsabilidade que me incutiu desde sempre.

Queria apresentar a minha gratidão ao Doutor Bernardo Quintella e à Doutora Catarina Mateus, do Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE) da Universidade de Lisboa, que através dos seus trabalhos me guiaram na execução desta dissertação.

Agradeço ao patologista Stephen W. Feist, do Centro de Informação em Doenças de Animais Aquáticos do Laboratório de Weymouth do CEFAS, em Weymouth, Reino Unido, pelos conhecimentos transmitidos na identificação das alterações patológicas e atribuição de grau de severidade em preparações microscópicas de brânquias de lampreia-marinha.

De igual modo, também agradeço ao Professor Doutor João Carrola, do Departamento de Engenharia Biológica e Ambiental, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, por todo o apoio e esclarecimentos prestados na identificação de alterações histológicas em brânquias de lampreia-marinha expostas a níveis de atrazina.

Os meus agradecimentos ao imprescindível suporte técnico e à generosidade da Engenheira Graça Machado que disponibilizou sempre os seus préstimos e, carinhosamente, me apoiou na execução do trabalho laboratorial. Agradeço também pela amabilidade, amizade e boa disposição durante todos os momentos passados na sua companhia.

Aos meus colegas do MARE, nomeadamente à Filipa Ferreira, à Marta Lourenço, ao Carlos Alexandre, e ao Tadeu Pereira agradeço toda a disponibilidade prestada sempre que solicitada.

Agradeço igualmente à restante equipa do projeto pertencente ao Departamento de Química da Universidade de Évora pela colaboração prestada na disseção das brânquias e obtenção da membrana basolateral.

À Professora Doutora Maria João Cabrita e à Doutora Raquel Garcia, do Departamento de Fitotecnia e do Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) da Universidade de Évora, o meu obrigada pela disponibilidade das instalações e dos equipamentos utilizados inerentes ao Programa Operacional Regional do Alentejo (InAlentejo).

Não posso esquecer de agradecer à Dona Antónia Oliveira, pela sua ajuda na execução do trabalho laboratorial, à Dona Balbina Mendes e à Dona Margarida Romão que sempre me complementaram na logística do trabalho laboratorial. Obrigada por me terem feito rir nos momentos de desânimo.

Um agradecimento especial ao meu primo José Maria, ao meu irmão Raimundo e à minha talentosa irmã Brígida Machado que tiveram a gentileza de me auxiliar, respetivamente, na formatação, na correção e na ilustração científica desta monografia. Agradeço igualmente à Susana Raposo de Almeida por me ter ajudado no *design* gráfico desta tese e na apresentação PowerPoint.

Não podia deixar de agradecer às pessoas mais importantes da minha vida. À minha família, pais, irmãos, pelo apoio incondicional que sempre me deram. Sei que estão orgulhosos de mim por ter concluído mais esta fase, e este trabalho é em parte para vós. Especialmente queria agradecer aos Meus Pais por terem suportado os encargos dos meus estudos e, pela confiança que me incutiram ao longo dos meus anos de vida. Sei, que é a vós que devo o facto de ser aquilo que sou hoje.

Gostaria de estender a minha gratidão e solidariedade a todos aqueles que de uma forma ou de outra (fornecendo ideias e/ou criticando), foram ajudando anonimamente nas inúmeras discussões instrutivas e que tornaram possível o avanço da investigação científica nesta área do conhecimento.

Finalmente, gostaria de agradecer ao Davies, o meu cão dedicado e inseparável, o qual esperou sempre pacientemente à porta do laboratório ao longo das horas intermináveis de trabalho sem pedir nada em troca. Prescindiu dos seus passeios para que eu pudesse levar a cabo este trabalho.

Este trabalho foi financiado por Fundos FEDER através do Programa Operacional Fatores de Competitividade – COMPETE e por Fundos Nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia no âmbito do Projeto Estratégico PEst-OE/AGR/UI0115/2014.

Resumo

Analisou-se a capacidade de resposta ao agente de *stress* atrazina (ATZ, 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropilano-1,3,5-triazine) em juvenis de lampreia-marinha de forma a prever possíveis consequências durante a migração trófica em direcção ao mar.

Os juvenis foram expostos, durante 30 dias, a duas concentrações de ATZ em água ($50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$). Foram analisados biomarcadores histopatológicos e bioquímicos de brânquia - perfil lipídico e atividade da Na^+/K^+ -ATPase da membrana basolateral (BLM) das células clorídricas de brânquia.

Verificou-se uma reestruturação lipídica dos fosfolípidos da BLM, por saturação de ácidos gordos e diminuição dos altamente insaturados proporcionando uma redução da permeabilidade branquial. Estas alterações estão correlacionadas positivamente com a atividade da Na^+/K^+ -ATPase a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de ATZ.

As lesões identificadas nas brânquias não comprometeram os processos de osmorregulação e de respiração.

Face ao *stress* causado pela exposição à ATZ, a brânquia de lampreia-marinha adopta uma estratégia compensatória ao nível da BLM de modo a garantir a sobrevivência dos juvenis no oceano.

Palavras-chave: lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.), biomarcadores, atrazina, osmorregulação, Na^+/K^+ -ATPase

Structural changes in basolateral membrane of gill chloride cells of sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.) juveniles after atrazine exposure.

Abstract

Maria Ana Potes Amaral Machado (2014). Structural changes in basolateral membrane of gill chloride cells of sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.) juveniles after atrazine exposure. Master Tesis (M. João Lança, advisor). Escola de Ciências e Tecnologia, Universidade de Évora, Évora, Portugal.

In this work, we studied sea lamprey juvenile's responsiveness to different atrazine (ATZ, 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropilano-1,3,5-triazine) concentrations to predict potential consequences to juveniles during downstream migration.

Sea lamprey's juveniles were exposed to 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of ATZ for 30 days. We analyzed gill histopathological and biochemical biomarkers (lipid profile and Na^+/K^+ -ATPase activity basolateral membrane (BLM) of gill chloride cells).

There was a lipid restructuring of the BLM gill cells phospholipids associated with a fatty acid saturation process and a decrease in high unsaturated fatty acids. These alterations were correlated positively with the activity of Na^+/K^+ -ATPase at 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ATZ concentration.

Low number of gills lesions and severity did not compromise the gill cell's physiology and sea lamprey juvenile's survival.

Due to the stress caused by ATZ exposure, the sea lamprey juveniles adopted a BLM compensatory strategy which guaranteed the downstream migration and ocean survival.

Key words: sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.), biomarkers, atrazine, osmoregulation, Na^+/K^+ -ATPase

Índice

Resumo	V
Abstract	VI
Índice	VII
Índice de figuras	IX
Índice de quadros	XIII
Abreviaturas e nomenclatura de enzimas	XV
Capítulo 1: Enquadramento Geral	18
Motivação	20
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
Capítulo 2: Revisão da Literatura	24
Lampreia-marinha <i>Petromyzon marinus</i>	24
Filogenia e taxonomia	24
Distribuição geográfica	25
Ciclo de vida	28
Breves noções de anatomofisiologia	30
Conceitos gerais de osmorregulação	35
Processo de osmorregulação no ciclo de vida da lampreia-marinha	36
Ecotoxicologia e biomarcadores	43
Biomarcadores bioquímicos	44
Biomarcadores histopatológicos	48
Xenobiótico atrazina	50
Capítulo 3: Metodologia	54
Estratégia	54
Organigrama	55
Procedimento experimental	56

Procedimentos éticos	56
Captura e eutanásia	56
Recolha dos tecidos, Lípidos e Ácidos Gordos	58
Determinação do colesterol total da BLM	60
Determinação das proteínas totais da BLM	60
Determinação da atividade enzimática da Na ⁺ /K ⁺ -ATPase da BLM	61
Análise histopatológica do tecido branquial	61
Capítulo 4: Resultados e Discussão	67
Capítulo 5: Conclusão	80
Capítulo 6: Referências Bibliográficas	82

Índice de figuras

Fig. 1 – Ilustração de lampreia-marinha <i>P. marinus</i> (autoria de Brígida Machado).....	25
Fig. 2 – Distribuição geográfica mundial de lampreia-marinha (Beamish, 1980; Maitland, 1980; Hardisty, 1986b; Halliday, 1991; Dempson e Potter 1993; Economidis <i>et al.</i> , 1999; Holčík <i>et al.</i> , 2004) adaptado de Quintella, 2006.....	25
Fig. 3 – Principais bacias hidrográficas Portuguesas e respetivos afluentes, com enfase na bacia hidrográfica do Lima. De norte para sul: Minho, Lima (seta vermelha), Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana. Adaptado de http://geoapoio.files.wordpress.com/2009/04/rios.jpg	27
Fig. 4 – Bacia hidrográfica do rio Lima e afluente rio Estorãos (Appelberg, 2005; INAG, 2012).....	28
Fig. 5 – Ciclo de vida da lampreia-marinha (modificado de Quintella, 2006 por Susana Raposo).....	29
Fig. 6 – Anatomia geral de lampreia-marinha. Adaptado de http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia_geral/chordata_peixes.ppt	30
Fig. 7 – Ilustração da cavidade bucal de lampreia-marinha <i>P. marinus</i> da autoria de Brígida Machado, com placas dentárias e placas linguais.	30
Fig. 8 – Vista lateral de corte da extremidade frontal de lampreia-marinha. Adaptado de http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia_geral/chordata_peixes.ppt	31
Fig. 9 – Organização branquial de diferentes espécies (Bond, 2006). As letras A e A1 correspondem à espécie mixinas, B e B1 a lampreia-marinha, C e C1 a elasmobrânquio e, D e D1 a teleósteo.	32
Fig. 10 – Circulação sanguínea branquial de lampreia-marinha e mecanismo de contracorrente (Schmidt-Nielsen, 1996; Evans <i>et al.</i> , 2005; Bond, 2006).	33
Fig. 11 – Ampliação de filamentos de brânquias de agnatas (lampreia de bolsa, <i>Geotria australis</i>), à esquerda (Bartels e Potter, 2004) e corte longitudinal de um filamento branquial de um elasmobrânquio (raia do Atlântico, <i>Dasuatis sabina</i>), à direita, por micrografia de varrimento electrónico (de Piermarini e Evans 2005). Observa-se uma artéria eferente (Ef.E), uma lamela de um filamento branquial (*) e espaço sanguíneo interlamelar formado por células pilar (seta).	33
Fig. 12 – Estrutura de lamelas de brânquias de teleósteos e seus constituintes celulares (Paulino <i>et al.</i> , 2012). Observam-se células pilar (CPi), células indiferenciadas (Ci), células pavimentosas (CPv), células clorídricas (CC), um seio venoso central (SVC), um filamento branquial (F) e uma lamela branquial (L). Coloração de Toluidina. Barra de escala: 20 µm.....	34

Fig. 13 – Mecanismos de osmorregulação de lampreia-marinha em ambiente dulçaquícola (à esquerda) e em ambiente marinho (à direita) do seu ciclo de vida (modificado de Hardisty et al., 1989).....	37
Fig. 14 – MRCs no epitélio branquial de um juvenil de <i>Geotria australis</i> (A e B) e de uma larva de lampreia <i>Petromyzon marinus</i> (C) (Bartels e Potter, 2004). A imagem (A) apresenta a contituição das IMRC entre duas camadas de CPvs epiteliais: superfície apical ampliada por micropregas delgadas e citoplasma apical constituído por um elevado número de túbulos e vesículas. A imagem (B) mostra uma camada de pregas (setas) na membrana da microprega, no lado citoplasmático e a (C) expõe as AMRC epiteliais com alargamento moderado da superfície apical mas sem vesículas citoplasmáticas e túbulos. Barras de escala: 2·µm (A), 0.2·µm (B) and 2·µm (C).	39
Fig. 15 – Subtipos de IMRCs e seu modo de funcionamento (Bartels e Potter, 2004). Observa-se nas imagens os diferentes tipos de transporte: activo (seta fina) e passivo (seta grossa) bem como a localização da anidrase carbónica citosólica (CA II).	40
Fig. 16 – Modelo de captação de Na ⁺ e Cl ⁻ de lampreia-marinha adulta, em água doce (Bartels e Potter, 2004). Observam-se os vários tipos de transporte que ocorrem na BLM em água doce: activo (seta fina) e passivo (seta grossa). As células IMRC-A e IMRC-B correspondem aos subtipos de IMRC: A e B, respetivamente e PC corresponde à célula epitelial pavimentosa.	40
Fig. 17 – CPvs epiteliais das brânquias de um adulto de <i>Lampetra fluviatis</i> , na migração de desova (Bartels e Potter, 2004). Observam-se duas camadas de epitélio lamelar com uma membrana externa de células pavimentosas (PC) e uma interna de células basais (BC). Barra de escala: 2 µm.	41
Fig. 18 – Corte transversal de um filamento do epitélio branquial de um adulto em água do mar (A) e de um jovem adulto de <i>Geotria australis</i> (à direita) em água doce (B) e após migração para a água do mar (C) (Reproduzido de Bartels et al (1996). Na imagem A, observam-se CCs em ambos os lados de um espaço sanguíneo. Barra de escala: 3 µm. No lado direito, superfícies apicais de CCs em que mostra pequena região circular alargada por microvilosidades em água doce (B) e região rectangular alargada por ausência de microvilosidades em água do mar (C). As IMRC estão presentes em A e ausentes em B. Barras de escala: 30 µm.	42
Fig. 19 – Modelo da secreção de N ⁺ por Cl ⁻ da lampreia-marinha, em água salgada (Bartels and Potter, 2004)..	42
Fig. 20 – Transportador iónico Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (adaptado de Watson e Barcroft, 2001).....	45
Fig. 21 – Modelo de funcionamento do transportador iónico Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (adaptado do Cummings, 2010)..	46
Fig. 22 – Topologia do complexo enzimático Na ⁺ /K ⁺ -ATPase na membrana celular e o local de ligação da ouabaina (Blanco e Mercer, 1998).	46

Fig. 23 – Constituição do epitélio branquial (A) e lesões histológicas mais comuns (B - F), induzidas por substâncias tóxicas (Machado, 1999, modificada de Mallat, 1985). A abreviatura <i>ib</i> corresponde à lamina basal, <i>cc</i> à célula clorídrica, <i>mu</i> à célula mucosa, <i>pi</i> à célula pilar, <i>ce</i> à célula epitelial lamelar, <i>svl</i> ao seio venoso lamelar e <i>csm</i> a um canal sanguíneo marginal.	49
Fig. 24 – Estrutura química da ATZ e seus principais metabolitos (Solomon <i>et al.</i> , 2008).	52
Fig. 25 – Delineamento experimental para avaliação de biomarcadores em BLM de brânquias de juvenis de lampreia-marinha expostos a diferentes concentrações de ATZ.	55
Fig. 26 – Sistema de suporte de vida e aquário de 300 L localizados no Fluvialário de Mora.	57
Fig. 27 – Cromatograma dos AGs do padrão FAME MIX 37 e do padrão interno C19:0.	60
Fig. 28 – Medições histológicas das preparações microscópicas de <i>P. marinus</i> . Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. A área amostrada está definida pela linha azul, o comprimento da lamela secundária pela linha vermelho, a área do <i>cluster</i> de CC pela linha verde e os núcleos por uma coloração rosa claro. Azul de Toluidine-PAS, ampliação: 200x.	63
Fig. 29 – Área de superfície dos <i>clusters</i> de células clorídricas da BLM do tecido branquial de juvenis a diferentes concentrações de ATZ.	70
Fig. 30 – Apresentação histológica observada em brânquias de <i>P. marinus</i> , na ausência de ATZ. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Pode-se notar a presença de <i>clusters</i> de células clorídricas e filamentos lamelares secundários de brânquias sem alterações histológicas.	70
Fig. 31 – Preparações histológicas do ensaio CI. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Observa-se, à esquerda, filamentos de lamelas (seta) e <i>clusters</i> de células clorídricas (circulo preto) e à direita, a cariólise de um núcleo de uma célula clorídrica pertencente a um <i>cluster</i>	71
Fig. 32 – Preparações do ensaio ATZ ₀ . Não se evidenciam de alterações histológicas. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x.	71
Fig. 33 – Preparações histológicas do ensaio ATZ ₅₀ . Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Observa-se a fusão de duas lamelas (circulos pretos) e descolamento epitelial ligeiro da lamela (circulo vermelho).	71
Fig. 34 – Preparações histológicas do ensaio ATZ ₁₀₀ . Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Observa-se hipertrofia lamelar e proliferação de células epiteliais (circulos verdes), alterações e ruptura de células pilar (circulos vermelhos), alterações na estrutura de células epiteliais (circulo preto), fusão lamelar extensa e proliferação de células epitelais que dificultam a captação de oxigénio das células sanguíneas (circulo roxo) e aumento do número de CCs dentro de um <i>cluster</i> de CCs (circulo laranja).	72

Fig. 35 – Distribuição das alterações histológicas mais evidentes nos grupos em estudo segundo o grau de severidade, proposto por Bernet <i>et al.</i> (1990).....	74
Fig. 36 – Distribuição das classes dos AGs de fosfolípidos de BLM do tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha aclimatados a diferentes concentrações de ATZ: SFA (azul escuro), MUFA (vermelho), PUFA (verde), ω 3-HUFA (roxo) e o índice de insaturados (azul claro).....	77
Fig. 37 – Análise da função discriminante canónica dos grupos ATZ ₀ , ATZ ₅₀ e ATZ ₁₀₀ que correspondem às respectivas cores: azul, verde, amarelo. Os círculos roxos correspondem a casos não agrupados, quadrado azul preenchido a centroides. 95,0% dos grupos originais estão correctamente classificados.....	78

Índice de quadros

Quadro 1 – Células epiteliais das brânquias de lampreia-marinha em diferentes estados de desenvolvimento (Bartels e Potter, 2004).....	38
Quadro 2 – Valores de concentração de ATZ detetados em águas superficiais em Portugal.....	52
Quadro 3 – Condições experimentais utilizadas na análise cromatográfica.....	59
Quadro 4 – Padrões de reação patológicos e fatores de importância propostos por Bernet (Bernet <i>et al.</i> , 1999). 64	
Quadro 5 – Parâmetros biométricos do grupo CI e dos grupos experimentais de juvenis de lampreia-marinha expostos a duas concentrações de ATZ.....	68
Quadro 6 – Pontuação das alterações histológicas.	73
Quadro 7 – Parâmetros bioquímicos da BLM do tecido branquial de juvenis do CI e expostos a diferentes concentrações de ATZ.....	74
Quadro 8 – Composição dos AGs dos fosfolípidos da BLM do tecido branquial de juvenis do CI e expostos a diferentes concentrações de ATZ.....	76
Quadro 9 – Classificação da análise discriminante nos ensaios CI, ATZ ₀ , ATZ ₅₀ e ATZ ₁₀₀	77
Quadro 10 – Resultado do Teste Wilks’ Lambda (Λ) para verificação da hipótese de que as médias dos centróides das funções são iguais nos três grupos experimentais.....	78

Abreviaturas e nomenclatura de enzimas

AA	Ácido araquidônico, do Inglês <i>Arachidonic acid</i>
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácido gordo
ALA	Ácido ω-linolénico, do Inglês <i>α-Linolenic acid</i>
AMP	Adenosina monofosfato
AMRC	Célula de amocete rica em mitocôndrias, do Inglês <i>Ammocoete mitochondria-rich cell</i>
ASE	Sistema de extração a alta pressão, do Inglês <i>Accelerated Solvent Extraction</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATZ	Atrazina
BF ₃	Triflureto de boro, do Inglês <i>Boron trifluoride</i>
BHT	Di-ter-butil metil fenol, do Inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i>
BLM	Membrana basolateral, do Inglês <i>Basolateral membrane</i>
BSA	Albumina de soro bovino, do Inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ²⁺	Ião cálcio
CC	Célula clorídrica
Ci	Célula indiferenciada
Cl ⁻	Ião cloreto
CM	Célula mucosa
CO ₂	Dióxido de carbono
CPi	Célula pilar
CPv	Célula epitelial pavimentosa
CT	Comprimento total do corpo
DHA	Ácido docosahexaenoico, do inglês <i>Docosahexaenoic acid</i>
DP	Desvio padrão
ELISA	Técnica imunológica, do inglês <i>Enzyme-linked Immunosorbent</i>
EPA	Ácido Eicosapentaenóico, do inglês <i>Eicosapentaenoic acid</i>
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina, do Inglês <i>Flavin Adenine Dinucleotide</i>
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos gordos, do Inglês <i>Fatty Acid Methyl Esters</i>
FCT	Fundação para a Ciência e Tecnologia
FID	Detetor de ionização por chama, do Inglês <i>Flame Ionization Detector</i>
Fig.	Figura
GC	Cromatografia gasosa, do Inglês <i>Gas Chromatography</i>
H ₂ O	Molécula de água
HUFA	Ácidos gordos altamente insaturados, do Inglês <i>High Unsaturated Fatty Acid</i>
ICAAM	Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas

IMRC	Célula intercalada rica em mitocôndrias, do Inglês <i>Intercalated mitochondria-rich cell</i>
LA	Ácido linoleico, do Inglês <i>Linoleic acid</i>
LT	Lípidos totais
MANOVA	Análise de variância multivariada, do Inglês <i>Multivariate analysis of variance</i>
MARE	Centro de Ciências do Mar e do Ambiente
MB	Massa branquial
MC	Massa corporal
MDA	Análise múltipla discriminante, do Inglês <i>Multiple Discriminant Analysis</i>
Mg ²⁺	Ião magnésio
MRC	Célula rica em mitocôndrias, do Inglês <i>Mitochondria-rich cell</i>
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados, do Inglês <i>Monounsaturated Fatty Acids</i>
Na ⁺	Ião sódio
NAD	Dinucleotídeo de adenina nicotinamida, do Inglês Nicotinamide Adenine Dinucleotide
Pi	Fosfato inorgânico
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados, do Inglês <i>Poliunsaturated Fatty Acid</i>
SFA	Ácidos gordos saturados, do Inglês <i>Saturated Fatty Acid</i>
SPSS	Pacote estatístico para Ciências Sociais, do Inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
EC 3.1.1.13	Colesterol esterase
EC 3.6.3.9	Sódio-potássio adenosina trifosfatase - Na ⁺ /K ⁺ -ATPase (NKA)

Capítulo 1: Enquadramento Geral

O presente trabalho intitula-se Alterações estruturais na membrana basolateral e células clorídricas de brânquias de lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) após exposição à atrazina e integrou-se do Projeto denominado “Avaliação do sucesso do recrutamento das principais populações portuguesas de *P. marinus* por biotransformação, marcadores de *stress* e transporte iónico em juvenis na fase de migração trófica” (PTDC/BIA-BEC/103258/200, FCT).

O objetivo geral deste trabalho foi averiguar se o perfil em ácidos gordos (AGs) dos fosfolípidos da membrana basolateral (BLM) das células clorídricas (CC) das brânquias em conjunto com biomarcadores histopatológicos podiam constituir uma ferramenta sensível para avaliar efeitos subletais da exposição à atrazina (ATZ) em juvenis de lampreia-marinha durante o processo de aclimação à salinidade e prever, desta forma, potenciais desequilíbrios na população que possam comprometer a sobrevivência no mar.

Esta dissertação encontra-se estruturada em seis capítulos. No primeiro capítulo, são expostas as motivações e objetivos definidos neste estudo. No segundo capítulo, é apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema em questão que abrange: i) o ciclo de vida da lampreia-marinha, ii) a distribuição geográfica, iii) o estatuto de conservação em Portugal, iv) aspetos gerais anatomofisiológicos relacionados com o processo de osmorregulação, v) a utilização de biomarcadores bioquímicos e histológicos para avaliar efeitos da exposição a xenobióticos presentes em ambientes aquáticos e vi) caracterização geral da ATZ bem como os seus efeitos em espécies aquáticas. No terceiro capítulo, é apresentado o delineamento experimental. No quarto capítulo apresentam-se os resultados obtidos e, no quinto, a interpretação, discussão e conclusão dos mesmos. Finalmente no último capítulo encontra-se a bibliografia consultada.

Motivação

As lampreias, juntamente com as mixinas, são de grande interesse biológico na medida em que representam o grupo mais antigo de vertebrados, os Agnatha (Le Blanc *et al.*, 1995).

A lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, L.) é uma espécie ameaçada em Portugal. O declínio da população de lampreia-marinha em território nacional deve-se principalmente à sobrepesca e às barreiras geográficas construídas ao longo dos rios, tal como os açudes e barragens, causando interrupção no percurso de migração reprodutiva (Almeida *et al.*, 2000; Quintella *et al.*, 2003; ICN, 2006). No entanto, a crescente poluição do meio dulçaquícola também tem contribuído para o declínio das populações portuguesas de lampreia-marinha (Almeida *et al.*, 2000; Quintella *et al.*, 2003; ICN, 2006).

Sabe-se que têm sido libertadas milhares de toneladas de pesticidas em ambientes aquáticos onde podem causar danos permanentes nos organismos que a eles se encontram expostos (Waring e Moore, 2004; Hostovsky *et al.*, 2014). Algumas dessas substâncias têm a capacidade de interferir com tecidos ou órgãos nomeadamente as brânquias (Graymore *et al.*, 2001). Por exemplo, a utilização de herbicidas para controlar determinadas ervas daninhas é uma prática reconhecida e aceite na agricultura mas, o seu uso indiscriminado, geralmente conduz a efeitos nefastos em diversos organismos com especial destaque, para as espécies aquáticas (Nwani *et al.*, 2010). Durante décadas em Portugal, o herbicida ATZ, atualmente proibido ao abrigo do Decreto-Lei nº306/2007, foi um dos mais utilizados na agricultura, sendo ainda hoje facilmente detetado em águas superficiais e subterrâneas (DGAV, 2014).

A exposição a um contaminante químico, na medida em que funciona como um agente de *stress*, pode causar lesões em diversos órgãos nas espécies aquáticas (Heath, 1987; Winkaler *et al.*, 2001; Martinez e Sousa, 2002; Fernandes e Mazon, 2003; Garcia-Santos *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2008; Paulino *et al.*, 2012; Hostovsky *et al.*, 2014). Inúmeros agentes de *stress* afetam as brânquias, podendo alterar a capacidade e/ou comprometer quer a função respiratória quer a função de osmorregulação (Bartels e Potter, 2004). Na lampreia-marinha, as CCs presentes nas brânquias desempenham um papel fundamental no processo de osmorregulação nomeadamente mediante o sistema enzimático Na^+/K^+ -ATPase que se encontra integrado na BLM destas células.

As membranas biológicas são a fronteira que separa os meios intracelular e extracelular sendo um alvo primordial quando ocorrem situações de contato com agentes de *stress*. Alterações nas condições ambientais podem causar modificações tanto na organização estrutural como na dinâmica dos lípidos membranares, podendo desta forma alterar o funcionamento das proteínas trans membranares e a atividade celular (Bystriansky e Ballantyne, 2007).

A necessidade de identificar e diferenciar agentes de *stress* em órgãos e/ou tecidos de espécies e/ou populações piscícolas permitiu desenvolver diferentes metodologias usadas para avaliação do efeito tóxico de substâncias poluentes. As alterações biológicas que expressem a exposição e ou efeito tóxico, causado por um determinado

contaminante presente no meio, são consideradas biomarcadores, sendo importantes para identificar atempadamente alterações em diversas espécies (Heath, 1987; Peakall, 1994; Cajaraville *et al.*, 2000; Lam e Gray, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003). Desta forma, alterações histológicas, bioquímicas, fisiológicas ou comportamentais aferidas em populações podem ser utilizadas como biomarcadores.

O uso de biomarcadores bioquímicos – tais como a caracterização de perfis lipídicos de um tecido e/ou órgão ou a determinação de atividades enzimáticas em membranas - e histológicos têm vindo a ser proposto como possível ferramenta para averiguar os efeitos, causados nos animais, resultantes da exposição a xenobióticos ou a outros contaminantes em águas naturais (Huggett *et al.*, 1992). A este facto acresce que, em virtude dos biomarcadores bioquímicos serem específicos para cada organismo, demonstram a capacidade de identificar e diferenciar lesões induzidas pelos poluentes (Schwaiger *et al.*, 1997).

Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi averiguar se o perfil em ácidos gordos (AGs) dos fosfolípidos da membrana basolateral (BLM) das células clorídricas (CC) das brânquias em conjunto com biomarcadores histopatológicos podia constituir uma ferramenta sensível para avaliar efeitos subletais da exposição à atrazina (ATZ) em juvenis de lampreia-marinha durante o processo de aclimação à água salgada e prever, desta forma, potenciais desequilíbrios na população que possam comprometer a sua sobrevivência no mar.

Objetivos específicos

I. Conhecer

- ✓ O ciclo de vida e o processo de osmorregulação da lampreia-marinha com especial destaque durante a fase de migração dos juvenis para o mar;
- ✓ A estrutura histológica das brânquias da lampreia-marinha e as células de brânquias e respetivas funções;
- ✓ A constituição geral das membranas biológicas com especial destaque para a membrana basolateral em termos de perfil lipídico e atividade do sistema enzimático Na^+/K^+ -ATPase;
- ✓ As principais características do poluente ATZ e a sua distribuição em águas naturais em Portugal.

II. Compreender

- ✓ As alterações histomorfológicas e/ou lesões do tecido branquial e das CCs de juvenis de lampreia-marinha quando expostos a $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ, durante 30 dias;
- ✓ Qual ou quais os efeitos que o herbicida ATZ pode induzir ao nível dos fosfolípidos da membrana basolateral das CCs, e a nível da atividade do sistema enzimático Na^+/K^+ -ATPase em juvenis expostos a $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ de ATZ, durante 30 dias.

III. Aplicar

- ✓ Metodologia histológica em tecido branquial;
- ✓ Análise microscópica do tecido branquial, identificação e classificação do grau de severidade das lesões, seguindo a metodologia do índice histopatológico proposto por Bernet *et al.* (1999);
- ✓ Metodologia para determinação do teor de lípidos totais (LT) e seu perfil em AGs presentes nas membranas celulares do tecido branquial mediante técnica de Extração por Solvente a Elevada Pressão (ASE);

- ✓ Metodologia para preparação de ésteres metílicos de AGs para cromatografia em fase gasosa (GC);
- ✓ Metodologia para a quantificação do teor de colesterol total (CT) nas membranas celulares do tecido branquial por métodos ELISA;
- ✓ Metodologia para a quantificação do teor proteico (PT) nas membranas celulares do tecido branquial pelo método do método modificado de Lowry et al. (1951);
- ✓ Metodologia para a determinação da atividade específica do sistema enzimático Na^+/K^+ -ATPase por método espectrofotométrico, na presença do inibidor ouabaína;
- ✓ Metodologia para tratamento estatístico dos dados.

IV. Valorizar

- ✓ Os parâmetros bioquímicos e histopatológicos de tecido branquial como biomarcadores naturais para avaliar os efeitos da exposição à ATZ na capacidade de osmorregulação de juvenis de lampreia-marinha e prever potenciais desequilíbrios nas populações em causa.

Capítulo 2: Revisão da Literatura

Lampreia-marinha *Petromyzon marinus*

Filogenia e taxonomia

As lampreias pertencem à ordem dos Petromyzontiformes, que juntamente com as Mixinas (ordem: Myxinidae) são os únicos representantes atuais da superclasse Agnatha (peixes desprovidos de mandíbula) (Hardisty e Potter, 1971a; Hardisty, 1986a; Hardisty, 1986b; Hardisty, 1986c). A superclasse Agnatha surgiu na era Paleozoica há aproximadamente 400-500 milhões de anos, estando o primeiro fóssil de lampreia datado aproximadamente em 360 milhões de anos (Wilkie, 2001; Janvier, 2007). Estas lampreias primitivas apresentavam uma morfologia geral já bastante semelhante às lampreias atuais e, deste modo, são consideradas como fósseis vivos, possuindo grande capacidade de adaptação a diversas condições ambientais que conduz à persistência ao longo do tempo (Janvier, 2007).

Em Portugal existem 6 espécies de lampreias: a lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*, Linnaeus, 1758), a lampreia-de-rio (*Lampetra fluviatilis*, Linnaeus, 1758), a lampreia-de-riacho (*Lampetra planeri* Bloch, 1784) e as três espécies endémicas de Portugal, a lampreia-da-costa-da-prata (*Lampetra alavariensis*, Mateus, Alves, Quintella e Almeida, 2013), a lampreia-do-nabão (*Lampetra auremensis*, Mateus, Alves, Quintella and Almeida, 2013) e a lampreia-do-sado (*Lampetra lusitanica*, Mateus, Alves, Quintella and Almeida, 2013), estas últimas descobertas recentemente e cujos nomes remetem para os locais de origem (Mateus *et al.*, 2013).

A lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*), ilustrada na Figura 1, é classificada segundo a seguinte posição filogenética descrita por Nelson (2006):

Filo Chordata

Subfilo Craniata

Superclasse Petromyzontomorphi

Classe Petromyzontida

Ordem Petromyzontiformes

Família Petromyzontidae

Subfamília Petromyzontinae

Género *Petromyzon*

Espécie *Petromyzon marinus*



Fig. 1 – Ilustração de lampreia-marinha *P. marinus* (autoria de Brígida Machado).

O género *Petromyzon* compreende apenas a espécie anádroma e a parasita *P. marinus* (Quintella, 2006). Considera-se como espécie anádroma aquela em que parte do seu ciclo de vida é passada em ambiente marinho e parte em água doce. No caso da lampreia-marinha, esta inicia o seu ciclo de vida em água doce, passando a fase adulta no mar e regressando à água doce para se reproduzir (Hardisty e Potter, 1971a).

Distribuição geográfica

A lampreia-marinha distribui-se em ambas as costas do Oceano Atlântico (Figura 2). Na América do Norte são encontradas indivíduos desta espécie desde Labrador até à Florida, nos grandes lagos Laurentians e nos lagos Finger, Gneida e Champlain (Applegate, 1950; Smith, 1971; Pearce *et al.*, 1980; Smith e Tibbles, 1980).

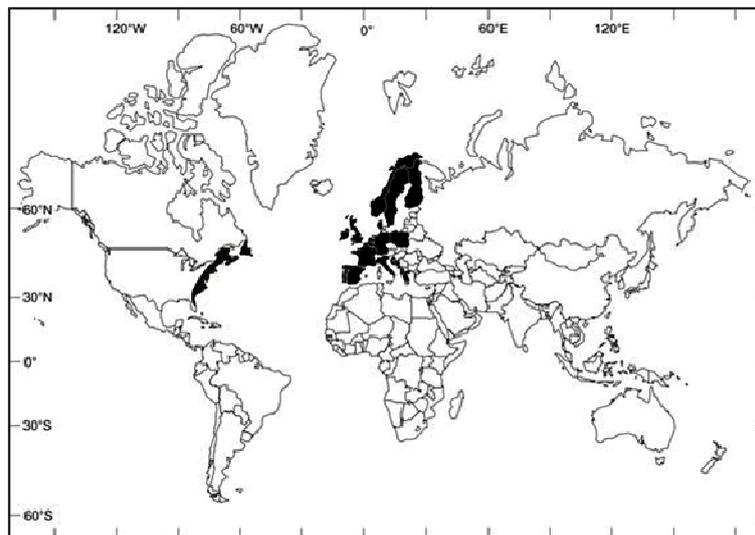


Fig. 2 – Distribuição geográfica mundial de lampreia-marinha (Beamish, 1980; Maitland, 1980; Hardisty, 1986b; Halliday, 1991; Dempson e Potter 1993; Economidis *et al.*, 1999; Holčík *et al.*, 2004) adaptado de Quintella, 2006.

Na Europa, a lampreia-marinha distribui-se desde o mar Barents até ao mar Mediterrâneo mas, nos últimos 30 anos, as populações têm sofrido uma diminuição drástica (Lelek, 1987; Renaud, 1997). Nos rios da Europa central, a sua existência reduz-se a um escasso número de indivíduos e, em alguns casos, à completa extinção (Freyof, 2002; Lusk *et al.*, 2002). Nas ilhas britânicas, as populações mais significativas encontram-se no sudoeste de Inglaterra, nos rios que drenam para o canal de Bristol e no sul do País de Gales (Maitland, 1980;

Maitland, 2003; Quintella, 2006). No Mar Mediterrâneo existem relatos da sua presença até à costa da Albânia no mar Adriático e em redor de Malta, Córsega e Sicília assim como na costa noroeste africana (Economidis *et al.*, 1999; Doadrio, 2001; Povz, 2002; Holčík *et al.*, 2004).

Em contrapartida, nos rios da Europa Ocidental a lampreia-marinha ainda é uma espécie abundante, sendo comum nos rios na Península Ibérica mas estando cada vez mais restrita às zonas mais a jusante dos mesmos (Hardisty, 1986b; Quintella *et al.*, 2003; Quintella, 2006). Nos rios Portugueses, nas últimas décadas vários autores observaram uma redução nas populações de lampreia-marinha sendo esta mais abundante nas regiões norte e centro do país (Figura 3) (Almeida *et al.*, 2000; Quintella *et al.*, 2003; Rogado *et al.*, 2005; Quintella, 2006). De facto, esta espécie pode ser encontrada em todas as principais bacias hidrográficas, com exceção dos rios Neiva e Ave, nos quais já ocorreu a sua extinção (Almeida *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2002; Quintella *et al.*, 2003; Rogado *et al.*, 2005). Assim sendo, em Portugal, a lampreia-marinha é classificada como “espécie vulnerável” no Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal (Rogado *et al.*, 2005). Um taxon diz-se vulnerável quando se considera que enfrenta um risco de extinção elevado na natureza.

No nosso país tem havido um declínio sucessivo da área de habitat utilizável, a qual é inferior a 100 km² (Rogado *et al.*, 2005). Relativamente ao efetivo populacional, não existem evidências de declínio, considerando-se que o efetivo populacional em Portugal, estimado com base no número de capturas de pescadores profissionais, não deva atingir os 100.000 indivíduos (Rogado *et al.*, 2005) e podendo as flutuações interanuais ser interpretadas como ciclos naturais.

A diminuição dos efetivos populacionais, está associada a vários fatores dos quais se destaca a construção de barragens, a destruição do habitat, a sobrepesca e a alteração da qualidade e disponibilidade de água (Quintella *et al.*, 2003; ICN, 2006). A crescente degradação dos ecossistemas dulçaquícolas tem sido, ao longo do tempo, a principal causa para o declínio de várias espécies piscícolas estritamente dulçaquícolas, da população de lampreia-marinha bem como de outras populações nativas de peixes diádrocos. A poluição, resultante de descargas de efluentes não tratados de origem industrial ou urbana, a par com fontes de poluição difusa, devidas à intensificação da utilização de pesticidas, e fertilizantes na agricultura, cria situações de perda da qualidade da água, podendo levar a situações de elevada toxicidade, com maior repercussão nos períodos de estiagem (ICN, 2006). A este respeito saliente-se que a utilização de herbicidas para controlar determinadas ervas daninhas é uma prática reconhecida e aceite na agricultura. Todavia, o uso indiscriminado de herbicidas geralmente apresenta também efeitos em diversos organismos com especial destaque para as espécies aquáticas (Nwani *et al.*, 2010).

Durante décadas em Portugal, o herbicida atrazina (1-Chloro-3-ethylamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazine), atualmente proibido, foi um dos mais utilizados em diversas culturas em ambiente rural, sendo ainda hoje facilmente detetado em corpos de água superficiais e subterrâneas (DGAV, 2015, ao abrigo do Decreto-Lei nº 306/2007), muitos dos quais na região norte de Portugal.

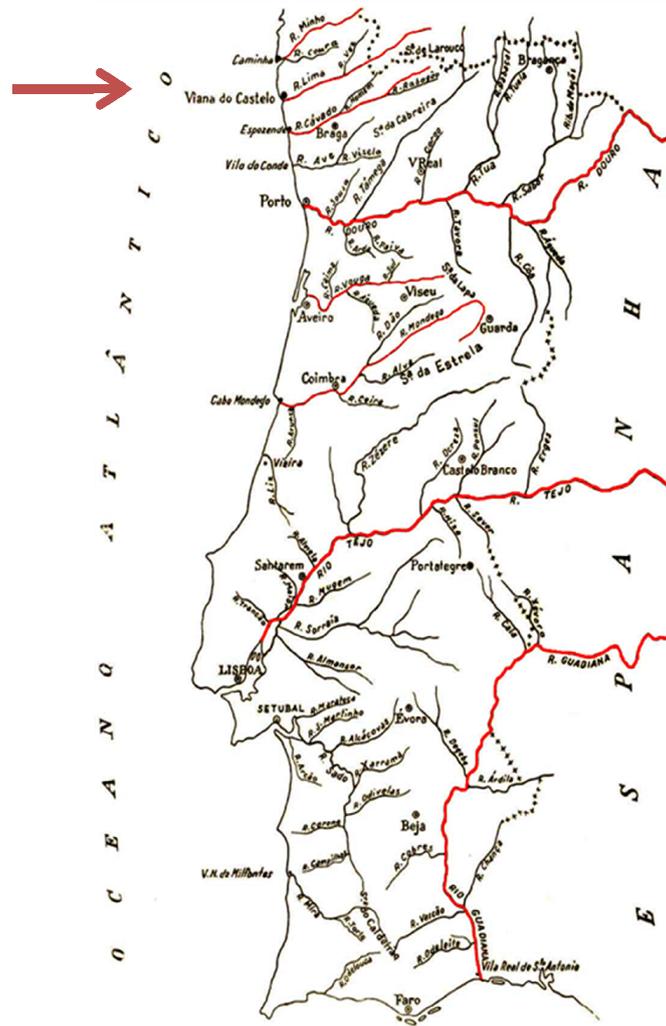


Fig. 3 – Principais bacias hidrográficas Portuguesas e respetivos afluentes, com ênfase na bacia hidrográfica do Lima. De norte para sul: Minho, Lima (seta vermelha), Cávado, Douro, Vouga, Mondego, Tejo e Guadiana.

Adaptado de <http://geoapoio.files.wordpress.com/2009/04/rios.jpg>

No presente estudo, os juvenis de lampreia-marinha foram capturados no afluente Estorãos da bacia hidrográfica do Lima, destacado na Figura 3, a qual tem registado alguma poluição relacionada com a presença de ATZ. Esta bacia hidrográfica tem uma superfície de aproximadamente 2 450 km², dos quais 1 140 km² (46,5%) em território português. O rio Lima (41° 40' N e 08°50' O) nasce em Espanha, na serra de S. Mamede a cerca de 950 m de altitude, tem cerca de 108 km de extensão, dos quais 67 km em território português, e desagua em Viana do Castelo. Na margem direita destacam-se os rios afluentes Castro Laboreiro, Labruja e Estorãos e na margem esquerda o rio Queijais (Figura 4). Considerando a totalidade da bacia do rio Lima verifica-se que o escoamento anual médio à entrada de Portugal é de cerca de 1 598 hm³ e que na foz é de 3 304 hm³. Estima-se uma precipitação média anual na bacia de 2 333 mm, correspondendo a 5 574 hm³. Deste volume, 2 270 hm³ perdem-se por evaporação e 2 776 hm³ infiltram-se, recarregando aquíferos. Resulta, portanto, um escoamento superficial imediato de 528 hm³. Dos 2 776 hm³ que se infiltram, surgem à superfície 2 776 hm³, perfazendo um escoamento superficial total de 3304 hm³ (INAG, 2000).



Fig. 4 – Bacia hidrográfica do rio Lima e afluente rio Estorãos (Appelberg, 2005; INAG, 2012).

Ciclo de vida

A lampreia-marinha é uma espécie anádroma, isto é, parte do seu ciclo de vida é passado em ambiente marinho e a outra em água doce, na qual sobe os rios para acasalar e reproduzir (Hardisty e Potter, 1971a) (Figura 5). Em traços gerais o seu ciclo de vida pode ser dividido em duas fases distintas, uma fase larvar e microfágica em ambiente dulçaquícola e uma fase adulta e parasítica em ambiente marinho (Hardisty e Potter, 1971b; Quintella, 2006). O desenvolvimento da fase larvar apresenta estágios metamórficos (Youson e Potter, 1979) que transformam larvas microfágicas (denominadas amocetes) desprovidos de olhos e dentição - que se alimentam, por filtração não seletiva de partículas orgânicas, de algas, diatomáceas e microorganismos em suspensão - em jovens pelágicos parasitas adaptados ao ambiente marinho (Hardisty, 1979; Doadrio, 2001)). Nos rios preferem fundos de cascalho e de gravilha escolhendo águas límpidas e oxigenadas pouco profundas e de corrente fraca. As larvas permanecem enterradas em fundos de substrato fino durante quatro a cinco anos (Quintella *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2015). Em Portugal, o processo de metamorfose ocorre entre Agosto/Setembro até Janeiro/Fevereiro e está associado ao comprimento médio do animal que é aproximadamente 140 mm (Quintella *et al.*, 2003; Quintella, 2006). Ao longo do processo de metamorfose, existem alterações e rearranjos teciduais, sendo os lípidos a principal fonte de energia durante este período não trófico (Youson, 1980). No fim da metamorfose, os amocetes são transformados em juvenis pelágicos que migram em direção ao mar (Beamish, 1980; Quintella *et al.*, 2003; Quintella, 2006; Dawson *et al.*, 2015). Após sensivelmente um ano e meio, retornam já adultos ao ambiente de água doce, com fins reprodutivos (Hardisty e Potter, 1971b; Doadrio, 2001; Quintella, 2006; Silva *et al.*, 2013).



Fig. 5 – Ciclo de vida da lampreia-marinha (modificado de Quintella, 2006 por Susana Raposo).

A lampreia-marinha é um ectoparasita pouco seletivo, sendo descritas como hospedeiras diversas espécies tais como: bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua* L., 1758), arenque do Atlântico (*Clupea harengus harengus*, L., 1758), arinca (*Melanogrammus aeglefinus* L., 1758), escamudo (*Polachius virens* L., 1758), abrótea-vermelha (*Urophycis chuss* Walbaum, 1792), esturjões (*Acipenser* spp.), sarda (*Scomber scombrus* L., 1758), salmão do Atlântico (*Salmo salar* L., 1758), espadarte (*Xiphias gladius* L., 1758), robalo-muge (*Morone saxatilis* Walbaum, 1792), anchova (*Pomatomus saltatrix* L., 1758), atum-rabilho (*Thunnus thynnus* L., 1758) e corvinata-real (*Cynoscion regalis* Bloch and Schneider, 1801), (Beamish, 1980; Farmer, 1980; Halliday, 1991), tubarões (*Cetorhinus maximus* Gunnerus, 1765, Beamish, 1980; *Carcharhinus plumbeus* Nardo, 1827; *Carcharhinus obscurus* Lesueur, 1818, Jensen e Schwartz, 1994; *Somniosus microcephalus* Bloch and Schneider, 1801, Gallant *et al.*, 2006), cetáceos e baleias (*Eubalaena glacialis* Müller, 1776 Nichols e Hamilton, 2004).

O início da migração reprodutora e consequente entrada nos estuários é influenciado por fatores físicos como a temperatura da água, tipo de substrato presente no rio e respetivo caudal (Morman *et al.*, 1980; Young *et al.*, 1990), bem como fatores biológicos como a libertação de feromonas por parte dos machos, as quais induzem nas fêmeas comportamentos reprodutivos e preferência pelo local de acasalamento e desova (Li *et al.*, 2002). O período de migração reprodutiva varia com a latitude, temperatura da água e caudal do rio (Hardisty e Potter, 1971b). Em Portugal, a migração inicia-se no período de Dezembro/Janeiro, com um pico em Fevereiro/Março, prologando-se até Maio/Junho, sendo que o período de maior afluência é em Fevereiro/Abril (Almeida *et al.*, 2000). Os machos são os primeiros a chegar ao sítio de acasalamento onde escolhem um local exposto a pouca ação da luz direta, alguma profundidade, corrente fraca e unidirecional. Após ritual de acasalamento, são depositados entre 152 000 a 300 000 ovos juntamente com o fluido espermático e ocorre a fecundação (Hardisty

e Potter, 1971b), morrendo os indivíduos pouco tempo depois devido ao esgotamento das reservas corporais, à quebra de mecanismos de regulação metabólica, ao avançado estado de deterioração dos diversos sistemas e à acumulação de substâncias tóxicas (Larsen, 1980).

Breves noções de anatomofisiologia

A lampreia-marinha apresenta um corpo longo, delgado e cilíndrico, comprimido lateralmente na parte posterior (Figura 1 e 6), revestido por epiderme estratificada, com glândulas mucosas, usado como defesa contra os predadores, e ausência de escamas (Hardisty e Potter, 1971a).

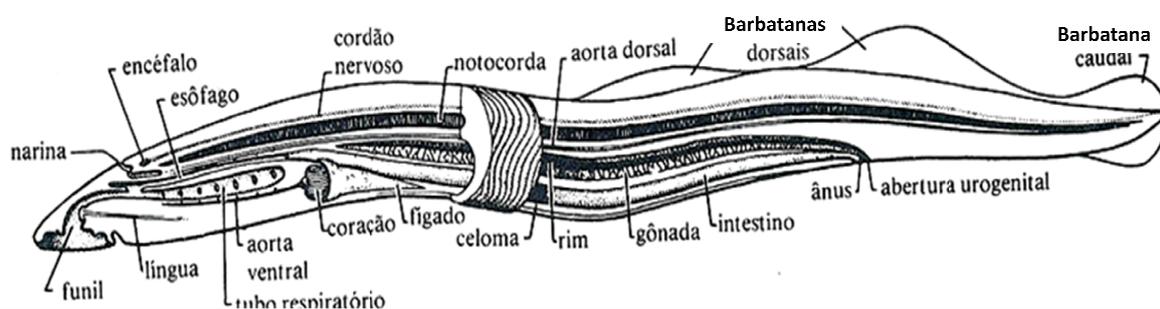


Fig. 6 – Anatomia geral de lampreia-marinha. Adaptado de http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia_geral/chordata_peixes.ppt.

A lampreia-marinha não apresenta mandíbulas (Agnata) mas possui uma boca semelhante a uma ventosa circular onde estão implantados dentes suctórios utilizados para perfurar a pele dos seus hospedeiros, e várias placas dentárias e duas placas linguais (Figura 7).



Fig. 7 – Ilustração da cavidade bucal de lampreia-marinha *P. marinus* da autoria de Brígida Machado, com placas dentárias e placas linguais.

O sistema muscular caracteriza-se por uma organização metamérica dando origem a vários miómeros que se distribuem desde a região cranial até à região genital anal (Hardisty e Potter, 1971a).

O seu esqueleto é cartilágneo e não possui barbatanas pares. Apresenta, todavia, uma barbatana caudal protócérquica e duas barbatanas triangulares localizadas na região dorsal, as quais acabam por se fundir numa só de acordo com a maturação sexual e o início do período de desova (Hardisty e Potter, 1971a).

A notocorda encontra-se envolvida por arcos neurais constituindo o eixo de sustentação do corpo. O crânio e arcos viscerais são cartilaginosos. O sistema nervoso apresenta um encéfalo diferenciado com 8 ou 10 pares de nervos cranianos (Hardisty e Potter, 1971a).

O aparelho digestivo é constituído pela boca, placas linguais, dentes córneos, faringe, esófago dorsal, intestino, fígado e ânus.

O aparelho respiratório inclui brânquias em bolsas saculiformes laterais à faringe (Figura 8). O aparelho excretor é composto por dois rins (mesonefro), um uréter, um seio urogenital e uma papila urogenital.

Quanto ao aparelho reprodutor a lampreia-marinha possui uma única gónada e poros genitais sendo a fecundação externa (Hardisty e Potter, 1971a).

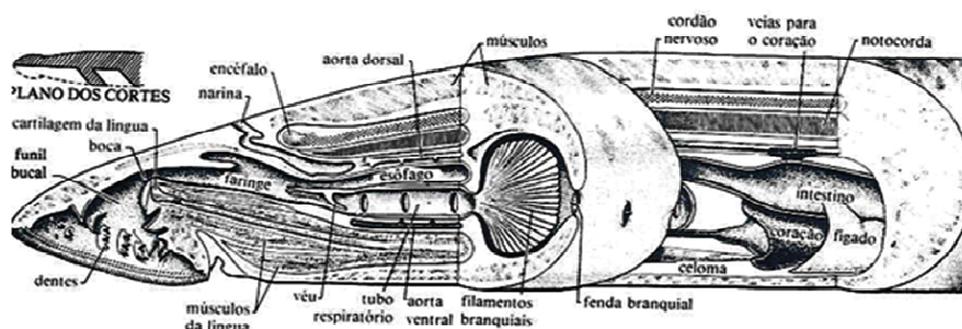


Fig. 8 – Vista lateral de corte da extremidade frontal de lampreia-marinha. Adaptado de http://www.dracena.unesp.br/graduacao/arquivos/zoologia_geral/chordata_peixes.ppt.

Particularidades da brânquia

A brânquia dos peixes possui uma vasta área de superfície de contacto com o meio externo e têm um papel importante na respiração, a osmorregulação e a ionorregulação (Bond, 2006).

As brânquias da maioria dos peixes localizam-se na região da cabeça e, nos teleósteos, são compostas por quatro arcos branquiais, na região lateral à faringe. Os raios branquiais estendem-se a partir da zona medial da base de cada arco branquial e entre os raios existe tecido conjuntivo que forma o septo interbranquial. De cada lado do septo emergem numerosos filamentos branquiais denominados hemibrânquias paralelos aos raios branquiais nos lados cranial e caudal do arco branquial. As duas hemibrânquias de um mesmo arco branquial formam uma

holo-brânquia. De cada arco branquial originam-se duas fileiras com um número elevado de filamentos branquiais designados também de lamelas primárias (Figura 9) cuja quantidade varia com vários fatores tais como o tamanho do animal, o habitat, entre outros (Bond, 2006).

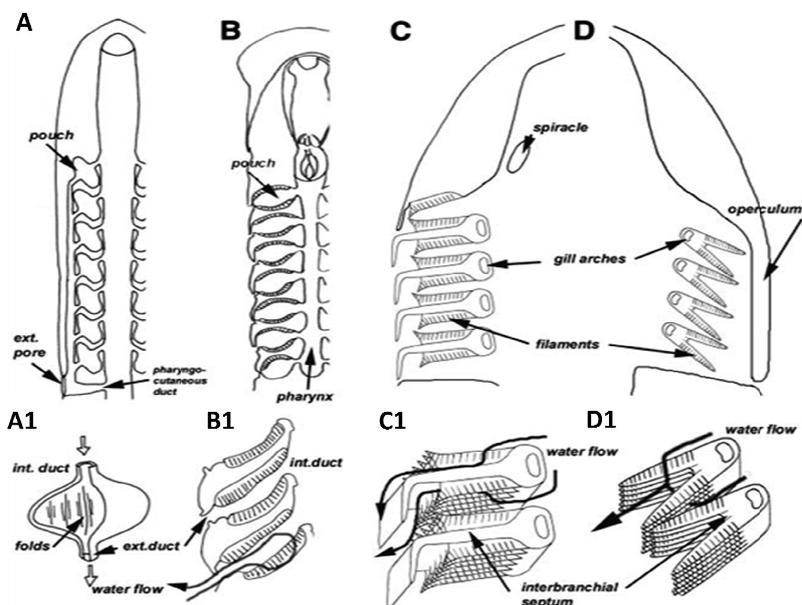


Fig. 9 – Organização branquial de diferentes espécies (Bond, 2006). As letras A e A1 correspondem à espécie mixinas, B e B1 a lampreia-marinha, C e C1 a elasmobrânquio e, D e D1 a teleosteo.

Nos agnatas, a base esquelética do arco branquial está situada externamente (lateral) às hemibrânquias e como os septos interbranquiais são ligeiramente côncavos, formam-se umas estruturas semelhantes a bolsas com poros internos e externos que comunicam com a faringe e com o meio circundante, respetivamente (Figura 9, B e B1). Deste modo, a lampreia-marinha apresenta seis pares de holo-brânquias, uma hemibrânquia cranial e uma hemibrânquia caudal no primeiro e último arco branquial, respetivamente. Assim, o sistema branquial é formado por sete pares de bolsas branquiais faríngeas posicionadas caudalmente ao olho em ambos os antímeros, dispostas em série, que permitem a comunicação com o sistema respiratório (Hardisty e Potter, 1971a) (Figura 9 B). Nos amocetes a faringe é contínua quer com a cavidade oral posicionada anteriormente quer com o esófago posteriormente. Todavia, durante a metamorfose a ligação entre a faringe e o esófago desaparece (Bond, 2006).

As brânquias são compostas por filamentos branquiais muito finos revestidos por uma membrana epidérmica igualmente delgada com numerosas pregas/lamelas altamente irrigadas. Os filamentos branquiais são a unidade básica e fundamental do tecido branquial (Evans *et al.*, 2005). Cada filamento é irrigado com sangue por uma artéria filamentosa aferente que percorre todo o eixo do próprio. Em oposição, as lamelas drenam o sangue venoso pela artéria filamentosa eferente que o transporta numa direção oposta ao transporte do sangue arterial (Figura 10) (Evans *et al.*, 2005).

As lamelas secundárias (da ordem dos milhares por filamento) têm origem na superfície dorsal e ventral dos filamentos ou lamelas primárias. As lamelas secundárias encontram-se orientadas perpendicularmente às lamelas

primárias, distribuídas regularmente ao longo do comprimento das últimas e entre elas encontram-se espaços por onde circula a água (Bartels e Potter, 2004; Evans *et al.*, 2005).

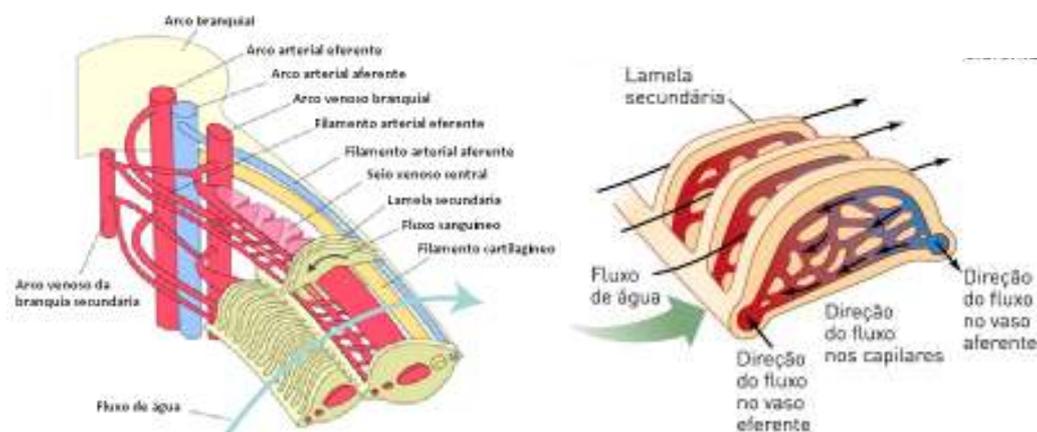


Fig. 10 – Circulação sanguínea branquial de lampréia-marinha e mecanismo de contracorrente (Schmidt-Nielsen, 1996; Evans *et al.*, 2005; Bond, 2006).

As lamelas secundárias aumentam a área de superfície dos filamentos e o fluxo sanguíneo que as irriga é orientado mediante um mecanismo de contracorrente. Este mecanismo de contracorrente permite a absorção mais eficiente do oxigénio, uma vez que o sangue que abandona as lamelas possui maior pressão parcial de oxigénio e menor pressão parcial de dióxido de carbono relativamente à água que flui nos espaços entre elas (Figura 11) (Heath, 1987; Schmidt-Nielsen, 1996). Assim, as lamelas são locais bem adaptados às trocas gasosas mas também ideais para processos de difusão de água entre o organismo e o meio ambiente (Bond, 2006).

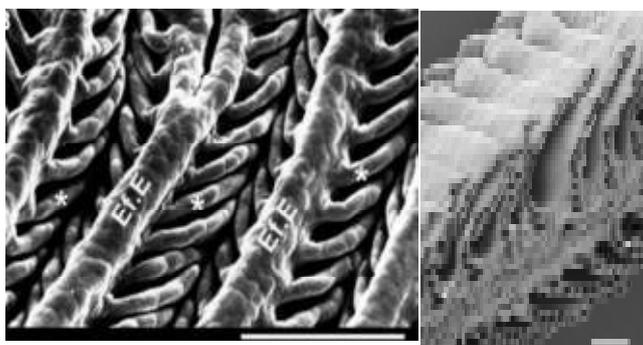


Fig. 11 – Ampliação de filamentos de brânquias de agnatas (lampréia de bolsa, *Geotria australis*), à esquerda (Bartels e Potter, 2004) e corte longitudinal de um filamento branquial de um elasmobrânquio (raia do Atlântico, *Dasuatis sabina*), à direita, por micrografia de varrimento electrónico (de Piermarini e Evans 2005). Observa-se uma artéria eferente (Ef.E), uma lamela de um filamento branquial (*) e espaço sanguíneo interlamelar formado por células pilar (seta).

De igual forma, a vasta área de superfície epitelial das lamelas que está em contacto com o meio externo e a alta taxa de perfusão também facilita o contacto com os poluentes presentes na água (Mallat, 1985; Heath, 1987; Wendelaar Bonga e Lock, 1992; Mela *et al.*, 2013; Hostovsky *et al.*, 2014). Pode afirmar-se que o epitélio

branquial de peixes é um tecido extremamente delgado e metabolicamente muito dinâmico (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994) mas devido ao seu contacto direto com o meio externo, este órgão é altamente susceptível a alterações que ocorram no meio ambiente (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994)

Características muito particulares do epitélio lamelar

O epitélio que cobre os filamentos branquiais e lamelas constitui uma fronteira nítida entre o meio externo e o meio extracelular e também desempenha um papel crítico na função branquial. As lamelas são constituídas por duas lâminas epiteliais. A externa em contacto com a água, consiste em células pavimentosas (CPVs), mucosas e MRCs (também designadas por CCs), e o folheto ou lâmina interna consiste em células indiferenciadas e neuroepiteliais, que recobrem as células pilar. As células pilar são responsáveis pela sustentação e formação de espaços entre células pilar adjacentes e as lâminas epiteliais. As células pilar possuem função contrátil e regulam o fluxo sanguíneo que circula nas lamelas (Figura 12). Todavia são as MRCs seguidas pelas CPVs que compreendem 10% e 90% da área de superfície epitelial, respetivamente (Evans *et al.*, 2005).

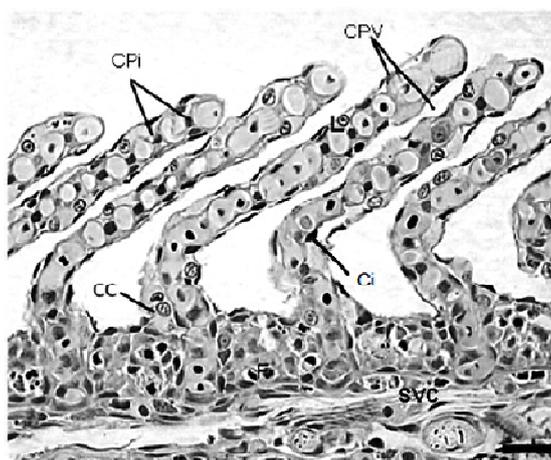


Fig. 12 – Estrutura de lamelas de brânquias de teleósteos e seus constituintes celulares (Paulino *et al.*, 2012). Observam-se células pilar (CPI), células indiferenciadas (Ci), células pavimentosas (CPV), células clorídricas (CC), um seio venoso central (SVC), um filamento branquial (F) e uma lamela branquial (L). Coloração de Toluidina. Barra de escala: 20 μ m.

Apesar das CPVs recobrirem maioritariamente a área da superfície do filamento branquial, estas desempenham um papel passivo na fisiologia branquial da maioria dos peixes. Executam funções importantes para as trocas gasosas pois são células escamosas ou cuboides finas com uma área de superfície apical (mucosa) extensa sendo geralmente as células primárias que cobrem os locais das trocas gasosas nas brânquias, ou seja, as lamelas (Larsen, 1991). A membrana apical das CPVs é caracterizada pela presença de microvilosidades que aumentam a área de superfície do epitélio mas também desempenham um papel importante na fixação de muco, produzido pelas células mucosas, na superfície dos filamentos (Wilson e Laurent, 2002).

Em Agnatas, as CPvs caracterizam-se pela presença de grânulos de secreção subapicais ou vesículas que contêm muco e se encontram fundidas à membrana apical (Bartels, 1989; Bartels 1998; Elger, 1987; Mallat and Paulsen, 1986; (Wilson e Laurent, 2002). As junções intercelulares (*tight junctions*) entre CPvs e células adjacentes são extensas ou com múltiplos filamentos, sendo relativamente impermeáveis a iões (Bartels 1988; Bartels 1991). A secreção de muco associada ao tipo de *tight junctions* desempenha uma função protetora contra poluentes, parasitas, agentes patogénicos, entre outros (Bartels e Potter, 2004; Evans *et al.*, 2005).

Em contraste com as CPvs, as MRCs ocupam uma fração muito reduzida da área de superfície do epitélio do filamento branquial, todavia são fundamentais para os processos de ião e osmorregulação. A ultra-estrutura e função destas células é altamente variável entre teleósteos, Agnatas e elasmobrânquios, no entanto existem algumas tendências gerais aplicáveis a todos os grupos: são células grandes com forma ovóide, têm elevada densidade mitocondrial no citoplasma em relação às CPvs e são extremamente polarizadas com morfologias distintas entre as suas membranas celulares apical e basolateral bem como nos perfis de expressão de transporte em proteínas (Evans *et al.*, 2005). Estas células são mais frequentes no extremo proximal dos filamentos aferentes e nas regiões interlamelares. O citoplasma das MRCs caracteriza-se ainda pela presença de um sistema de túbulos membranosos (Karnaky *et al.*, 1976b; Pisam e Rambourg, 1991), que representa uma grande amplificação intracelular da BLM e onde se localiza a proteína intrínseca de membrana Na^+/K^+ -ATPase e o sistema de co-transporte de $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (Karnaky *et al.*, 1976b; Eriksson *et al.*, 1985). Desta forma, nos peixes teleósteos marinhos, o ião cloreto (Cl^-) é secretado por este tipo de célula através de um transporte ativo secundário e o ião sódio (Na^+) é transportado passivamente através das junções entre as MRCs adjacentes (Foskett e Scheffey, 1982; Foskett e Machen, 1985).

As MRCs são identificadas apenas no estado adulto da lampreia-marinha e existem quer em meio marinho quer em meio dulçaquícola, havendo assim dois subtipos de MRCs: células ricas em mitocôndrias intercalares (IMRC) ou de água doce e as células mitocondriais de água salgada ou células clorídricas (CC) (Evans *et al.*, 2005). As suas particularidades serão abordadas em pormenor mais à frente durante a descrição do processo de osmorregulação durante o ciclo de vida da lampreia-marinha.

Conceitos gerais de osmorregulação

A água é fundamental quer para a vida animal quer para as diversas reações metabólicas celulares nas quais é crucial a manutenção de um meio intracelular aquoso apropriado (Bradley, 2009). A nível molecular pode afirmar-se que a configuração das proteínas e a sua função é fortemente influenciada pela atividade da água e pela concentração de iões presentes e a nível celular. A capacidade de osmorregulação assegura a manutenção de um meio apropriado para as reações metabólicas e controla ainda o volume celular (Bradley, 2009). Finalmente a nível do organismo, os órgãos associados à função de osmorregulação proporcionam a captação de iões e a retenção de água em situações de ambientes secos/meio marinho e a eliminação de excesso de água em meios sem privação da mesma/meio de água doce (Bradley, 2009). Na medida em que o transporte ativo da água não

ocorre nos sistemas biológicos, o transporte ativo de iões torna-se fundamental para a regulação da mesma (Bradley, 2009). Desta forma, o processo de osmorregulação define-se como a capacidade que alguns animais possuem em manter a pressão osmótica dos tecidos em valores constantes e dentro de uma faixa ideal de variação, independentemente do meio externo (Bradley, 2009).

Os peixes de água doce apresentam uma concentração osmótica interna entre 230-300 mOsm que é hipertónica relativamente ao meio onde se encontram. Desta forma têm que fazer face a dois desafios fisiológicos: a difusão de água do meio para o organismo associado ao facto dessa mesma água apresentar concentrações muito baixas de iões e, a necessidade de manutenção de um gradiente de saída de iões para o meio ambiente (Bradley, 2009). Devido às particularidades do seu tegumento, especialmente na zona das brânquias, os peixes de água doce recebem um influxo de água do meio, cujo volume fisiológico é mantido mediante a produção de uma urina diluída (20 mOsm) mas não isenta de iões (Bradley, 2009). Desta forma, mediante a eliminação de apenas urinas diluídas, os peixes de água doce conseguem manter a homeostasia do volume celular mas não a homeostasia iónica (Bradley, 2009). Para fazer face à perda iões na urina, existe um mecanismo ativo de captação de iões do meio para o organismo ao nível das brânquias, nomeadamente, Na^+ e Cl^- . Diz-se que estes animais são hiper-reguladores (Bradley, 2009).

Em oposição, os peixes marinhos teleósteos são hipo-reguladores restritos pois mantêm a concentração iónica interna em valores inferiores aos do meio externo. Saliente-se que um peixe teleósteo caracteriza-se por apresentar uma concentração osmótica interna entre 250-300 mOsm encontrando-se num meio cuja concentração é perto de 1000 mOsm (Bradley, 2009). Nesta situação, um dos desafios fisiológicos reside na perda de água por osmose a nível das brânquias, a qual não é acompanhada pela excreção de sais. Esta situação, se não for regulada, conduz inevitavelmente a uma acumulação de sais nos tecidos e a um aumento da concentração osmótica dos mesmos (Bradley, 2009). A forma de regular este processo passa pela ingestão de água salgada e consequente absorção intestinal de iões, conduzindo a uma situação de osmose de água para o organismo (Bradley, 2009). Esta função é compensada pelo sistema renal, o qual produz urinas isosmóticas relativamente ao sangue mas ricas em determinados iões, como cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e bicarbonato (HCO_3^-) (Bradley, 2009). Todavia, esta excreção não regula o problema osmótico derivado da ingestão de água salgada. A excreção dos iões em excesso, resultantes da ingestão de água salgada, principalmente Na^+ e Cl^- , é feita nas MRCs (ou CCs), como já anteriormente mencionado. A sua função detalhada e aplicada especificamente à lampreia-marinha encontra-se descrita mais à frente neste trabalho.

Processo de osmorregulação no ciclo de vida da lampreia-marinha

A lampreia-marinha permanece uma parte substancial do seu ciclo de vida em água doce (Hardisty e Potter, 1971a; Hardisty e Potter, 1971b) tal como já foi referido. Deste modo, os mecanismos de osmorregulação evoluíram de modo a manter as concentrações internas de Na^+ e Cl^- em níveis superiores aos presentes na água

doce e, muito inferiores aos presentes no meio durante a fase marinha do seu ciclo de vida (Morris, 1972; Beamish *et al.*, 1978).

Fase de água doce

Os amocetes são incapazes de osmorregular em ambientes em que a osmolalidade seja superior à do seu próprio plasma, isto é, aproximadamente 225 mosmol.kg⁻¹ (Beamish *et al.*, 1978; Morman *et al.*, 1980; Morris, 1980). Aproximadamente 50% das larvas morrem em 24 h quando transferidas para água com 350 mosmol kg⁻¹, ou seja, um terço da força iônica da água do mar. Em contrapartida, os jovens adultos, que recentemente sofreram metamorfose, são capazes de se aclimatar à água do mar e manter sua osmolaridade sérica em aproximadamente 260 mosmol.kg⁻¹ (Beamish *et al.*, 1978). Esta capacidade de regulação é tão eficaz que mais de 80% dos juvenis pode sobreviver à transferência direta entre água doce e água do mar (Potter e Beamish, 1977). Todavia a capacidade de osmorregular em ambientes hipertônicos é perdida na lampreia-marinha adulta imediatamente após iniciar a migração reprodutiva (Morris, 1956; Pickering e Morris, 1970).

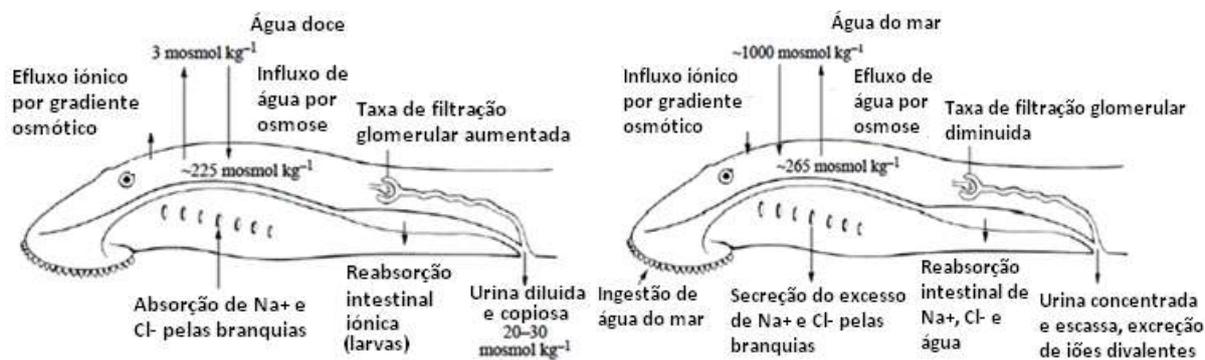


Fig. 13 – Mecanismos de osmorregulação de lampreia-marinha em ambiente dulçaquícola (à esquerda) e em ambiente marinho (à direita) do seu ciclo de vida (modificado de Hardistry *et al.*, 1989).

Em água doce, a lampreia-marinha é sujeita a um influxo osmótico de água e a um efluxo iônico através das brânquias. Este problema é ultrapassado pela absorção ativa de iões pelas brânquias e pela excreção de urina diluída pelo rim (Figura 13) (Perry, 1997). Esta regulação iônica é similar a vários vertebrados de água doce e a entrada de Na⁺ e Cl⁻ é estequiometricamente equilibrada compreendendo a troca por H⁺ e HCO₃⁻ respetivamente (Kirschner, 1983). Alguns estudos demonstraram que a troca de Na⁺ por H⁺ envolve a secreção ativa de H⁺ mediante H⁺-ATPase eletrogénica e absorção de Na⁺ através de um canal iónico epitelial de sódio (ENaC) existente na membrana apical das células. Este mecanismo é assim dependente quer da atividade da anidrase carbónica nas células secretoras de H⁺ quer da atividade da Na⁺/K⁺-ATPase existente na membrana basolateral das células (Harvey e Ehrenfeld, 1986; Harvey *et al.*, 1988; Nagel e Dörge, 1996; Ehrenfeld e Klein, 1997). A absorção de Cl⁻ ocorre diretamente por meio de um sistema antiporte HCO₃⁻/Cl⁻ (Marshall *et al.*, 1997) e as células envolvidas nessa absorção apresentam um enzima citoplasmático, anidrase carbónica, e muito provavelmente um canal de Cl⁻ na sua membrana basolateral (Larsen, 1991).

Adaptações do epitélio branquial da lampreia-marinha durante a fase de migração trófica

O epitélio branquial sofre alterações marcadas durante o ciclo de vida da lampreia-marinha. Na medida em que estas modificações são muitas e seria fastidioso descrevê-las em pormenor, apenas iremos abordar e discutir as adaptações do epitélio branquial relacionadas com a etapa do ciclo de vida que se enquadra neste estudo (i.e. jovens adultos). Todavia, a título de exemplo, referem-se as várias células e a fase em que estão presentes no ciclo de vida da lampreia-marinha (Quadro 1).

Quadro 1 – Células epiteliais das brânquias de lampreia-marinha em diferentes estados de desenvolvimento (Bartels e Potter, 2004).

Estado Desenvolvimento	IMRC (célula intercalada rica em mitocôndrias)	AMRC (célula de amocete rica em mitocôndrias)	CC (célula clorídrica)	CPv (célula pavimentosa)
Fase larvar	+	+	-----	++
Fase juvenil de migração trófica	+	-----	+	++
Fase marinha	-----	-----	+	++
Fase adulta de migração reprodutiva	+	-----	Regressão	++

Durante o ciclo de vida existem alterações na composição celular, nas relações espaciais entre células e na estrutura das *tight junctions* presentes no epitélio branquial. A camada celular externa dos filamentos de brânquias e das lamelas de amocetes compreende dois tipos de MRCs (células ricas em mitocôndrias de amocete - AMRCs e células ricas em mitocôndrias intercaladas – IMRCs) para além das CPvs (Bartels *et al.*, 1998). Durante a metamorfose, as AMRCs desaparecem e as CCs desenvolvem-se (Peek e Youson, 1979b). Assim, após a conclusão da metamorfose, o epitélio branquial do juvenil na fase de migração em direção ao mar possui CCs, IMRCs e CPvs. As IMRCs desaparecem após o jovem adulto entrar no mar e só reaparecem na altura da migração reprodutiva já em meio dulçaquícola (Bartels *et al.*, 1998). Em contrapartida, as CCs regridem gradualmente durante a migração reprodutiva (Morris, 1957; Morris e Pickering, 1976).

A presença ou ausência de diferentes tipos de células de brânquias em diferentes fases do ciclo de vida da lampreia-marinha sugere quais as células que estão envolvidas na regulação osmótica em ambiente de água doce e marinho. Atendendo a que as IMRCs são o único tipo presente em todas as etapas do ciclo de vida que decorre em água doce e estão ausentes durante a fase marinha, presume-se que desempenhem papel crucial na regulação osmótica quando a lampreia-marinha está em meio hipo-osmótico. Na medida em que as CCs se desenvolvem imediatamente antes da fase oceânica e regridem logo após a conclusão desta, indica o seu papel na osmoregulação da lampreia-marinha quando em meio hiper-osmótico. As CPvs são o único tipo de célula presente na superfície branquial ao longo de todo o ciclo de vida da lampreia-marinha (Bartels e Potter, 2004).

As IMRCs dos juvenis de lampreia-marinha são caracterizadas pela presença de numerosas vesículas membranosas e túbulos entre as mitocôndrias (Figura 14) e encontram-se geralmente confinadas à região basal dos filamentos e entre as lamelas (Bartels *et al.*, 1998; Bartels e Potter, 2004). No modelo proposto para a

lampreia-marinha, a grande maioria das IMRCs pertence aos subtipos A e C. Nas células do tipo C, a presença, na membrana apical, de um permutador de aniões (Cl^- e HCO_3^-), em paralelo com o enzima H^+ -V-ATPase na membrana apical permite que os iões H^+ sejam secretados ativamente para se ligarem ao ião HCO_3^- , estabelecendo-se desta forma um gradiente de HCO_3^- celular que leva à captação de iões Cl^- . As IMRCs (subtipos A e C) podem ainda facilitar a captação de Na^+ por secreção ativa de H^+ , sendo as CPVs presentes as principais candidatas à captação de Na^+ (Figura 15) (Bartels *et al.*, 1998; Bartels e Potter, 2004).

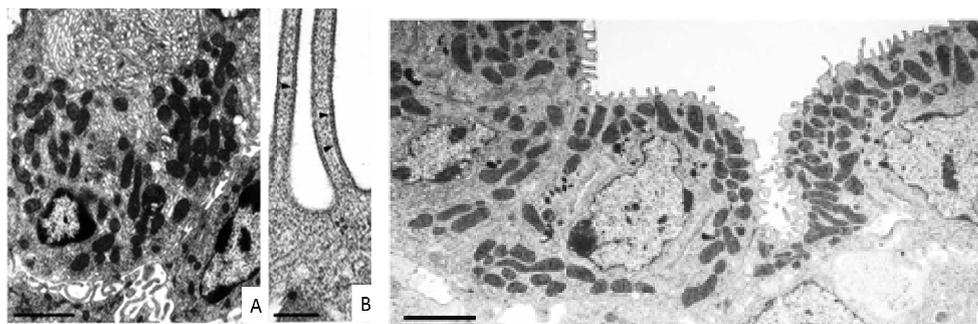


Fig. 14 – MRCs no epitélio branquial de um juvenil de *Geotria australis* (A e B) e de uma larva de lampreia *Petromyzon marinus* (C) (Bartels e Potter, 2004). A imagem (A) apresenta a contituição das IMRC entre duas camadas de CPVs epiteliais: superfície apical ampliada por micropregas delgadas e citoplasma apical constituído por um elevado número de túbulos e vesículas. A imagem (B) mostra uma camada de pregas (setas) na membrana da microprega, no lado citoplasmático e a (C) expõe as AMRC epiteliais com alargamento moderado da superfície apical mas sem vesículas citoplasmáticas e túbulos. Barras de escala: 2 μm (A), 0.2 μm (B) and 2 μm (C).

Ainda com base no mesmo modelo de funcionamento assume-se que o Na^+ é absorvido pelas CPVs e a energia necessária ao processo é gerada pela atividade da bomba de Na^+/K^+ -ATPase localizada na BLM das CCs de brânquias (Figura 16). Sob tais condições, a secreção de H^+ pode fornecer a energia necessária para a absorção de Cl^- através das IMRCs do subtipo C. Em contraste, uma vez que os requisitos para um acoplamento de absorção de Na^+ e secreção H^+ são satisfeitos em adultos, a secreção de H^+ através dos subtipos A e C pode também facilitar a captação de Na^+ nas fases adultas do ciclo de vida para além da absorção de Cl^- efetuada conjuntamente (Bartels e Potter, 2004).

Relativamente às CPVs pode dizer-se que cobrem toda a superfície lamelar e parte da região interlamelar do filamento, são caracterizadas pela presença de numerosos grânulos ovóides mucosos, localizadas no citoplasma apical, um retículo endoplasmático rugoso com poucas cisternas, um aparelho de Golgi muito desenvolvido, poucas mitocôndrias (Figura 17) e apresentam a superfície apical constituída por microvilosidades curtas (Wade *et al.*, 1975; Bartels e Potter, 2004). A membrana apical apresenta-se assim como uma estrutura relativamente impermeável à água ajudando a proteger estes animais contra um influxo osmótico de água através das brânquias durante a fase do ciclo de vida em água doce (Bartels e Potter, 2004).

Subtipos de IMRC

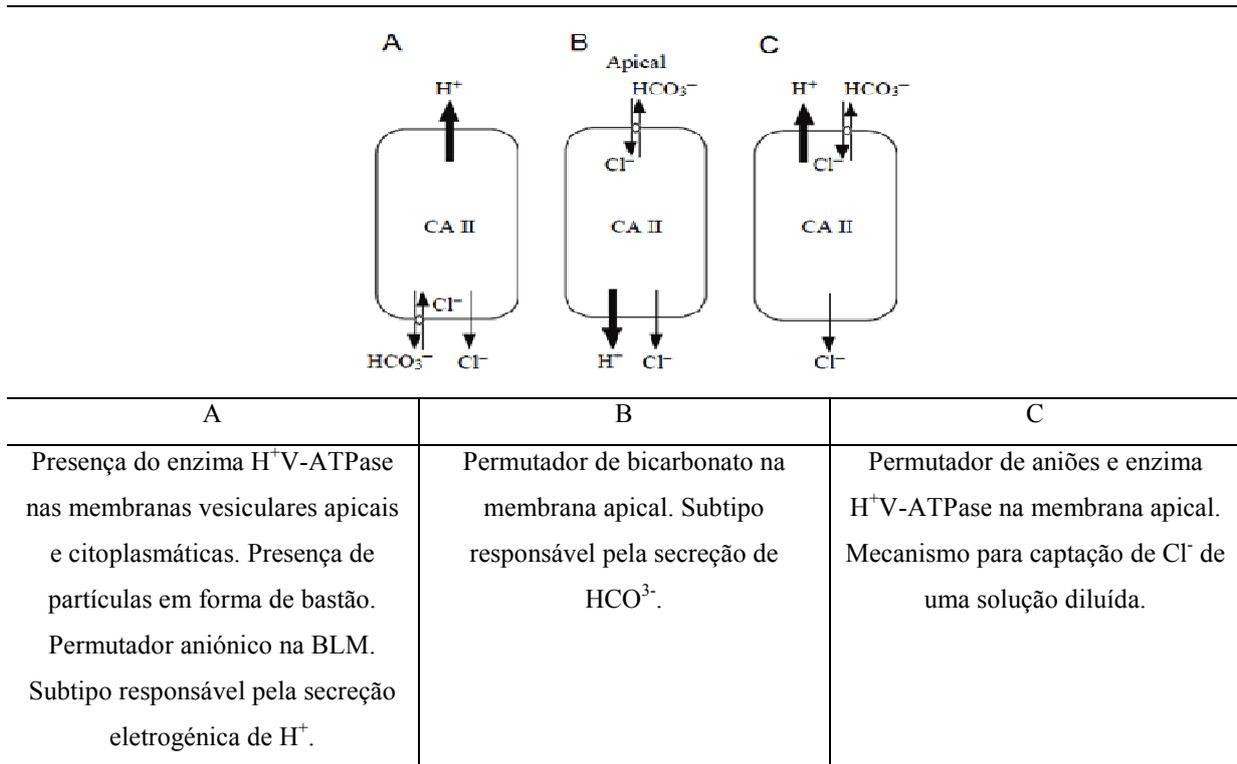


Fig. 15 – Subtipos de IMRCs e seu modo de funcionamento (Bartels e Potter, 2004). Observa-se nas imagens os diferentes tipos de transporte: activo (seta fina) e passivo (seta grossa) bem como a localização da anidrase carbónica citosólica (CA II).

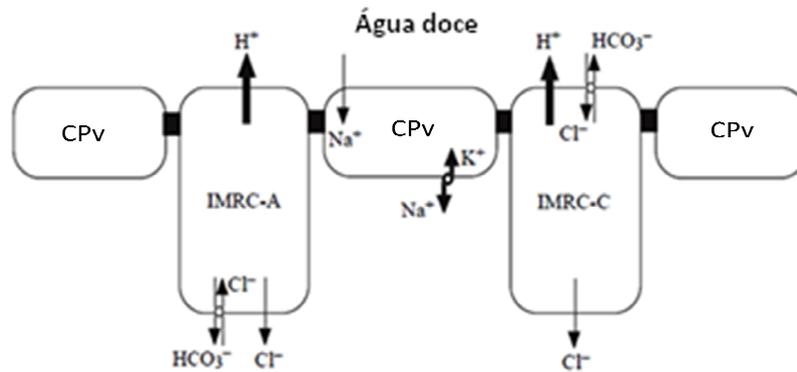


Fig. 16 – Modelo de captação de Na^+ e Cl^- de lampreia-marinha adulta, em água doce (Bartels e Potter, 2004). Observam-se os vários tipos de transporte que ocorrem na BLM em água doce: activo (seta fina) e passivo (seta grossa). As células IMRC-A e IMRC-B correspondem aos subtipos de IMRC: A e B, respetivamente e PC corresponde à célula epitelial pavimentosa.

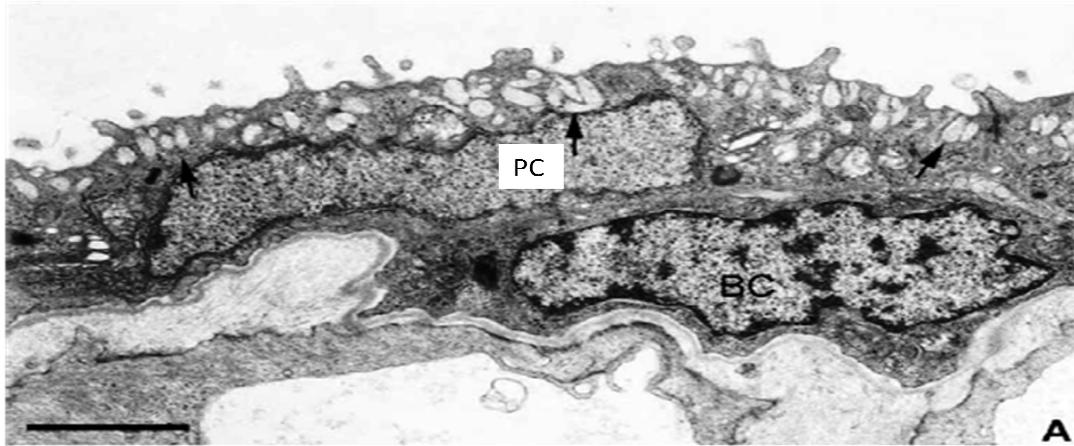


Fig. 17 – CPVs epiteliais das brânquias de um adulto de *Lampetra fluviatilis*, na migração de desova (Bartels e Potter, 2004). Observam-se duas camadas de epitélio lamelar com uma membrana externa de células pavimentosas (PC) e uma interna de células basais (BC). Barra de escala: 2 µm.

Na lampreia-marinha, as CCs apresentam um formato discoide e dispõem-se em filas contínuas que se estendem por toda a região interlamelar dos filamentos (Figura 18; Bartels et al, 1996). O citoplasma contém numerosos túbulos membranosos entre os quais estão intercaladas mitocôndrias. Estas membranas tubulares constituem uma vasta ampliação da membrana intracelular basolateral e o lúmen dos túbulos constitui o espaço extracelular (Karnaky *et al.*, 1976a; Peek e Youson, 1979a). Nos jovens adultos em migração trófica a superfície das CCs, exceto numa pequena região circular central, está recoberta por junções com as CPVs adjacentes. Após os jovens adultos entrarem em meio marinho, essas junções retraem-se e expõem a superfície celular. Além disso, a superfície apical perde as suas curtas microvilosidades e torna-se relativamente lisa (Bartels *et al.*, 1996). Como consequência das alterações na superfície do epitélio branquial, o comprimento da via paracelular entre CCs adjacentes é aumentado quatro a cinco vezes e os túbulos membranosos no citoplasma, que estão desorganizados em fase de água doce, reorganizam-se e alinham-se quando o animal entra no mar.

Pode concluir-se que as MRCs (ou CCs) são células secretoras organizadas em unidades multicelulares, apresentam uma via paracelular extensa de comunicação permeável entre as células secretoras e a sua membrana basolateral é muito amplificada, proporcionando espaço para um grande número de bombas de Na^+/K^+ -ATPase. Conclui-se assim que, tal como nas brânquias dos peixes teleósteos marinhos, a CC de lampreia-marinha em ambientes hipertônicos é responsável pela secreção de Na^+ absorvido através do epitélio intestinal (Figura 19), após ingestão de água salgada. Já a secreção de Cl^- envolve um transporte ativo secundário de Cl^- através das CCs que, por sua vez, aciona o movimento passivo paracelular de Na^+ (Bartels *et al.*, 1996). Ao iniciar a migração reprodutora, as CCs ficam recobertas com as junções das CPVs adjacentes e sofrem um processo de apoptose.

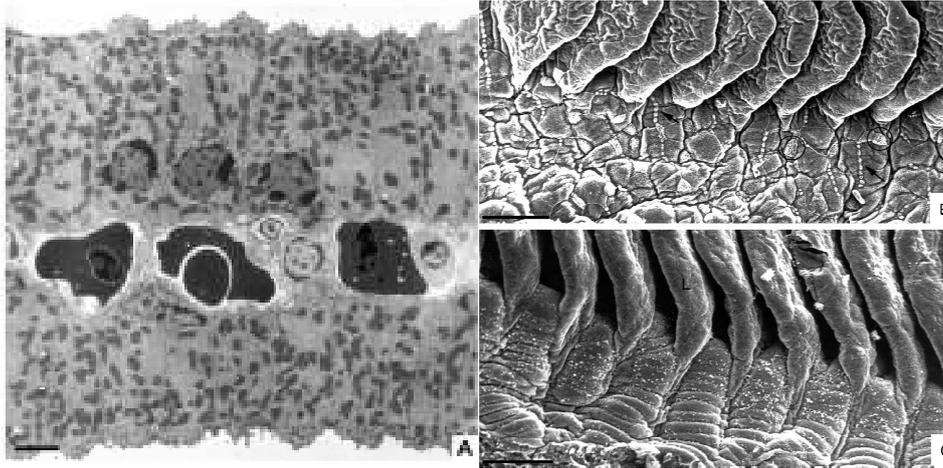


Fig. 18 – Corte transversal de um filamento do epitélio branquial de um adulto em água do mar (A) e de um jovem adulto de *Geotria australis* (à direita) em água doce (B) e após migração para a água do mar (C) (Reproduzido de Bartels et al (1996). Na imagem A, observam-se CCs em ambos os lados de um espaço sanguíneo. Barra de escala: 3 μ m. No lado direito, superfícies apicais de CCs em que mostra pequena região circular alargada por microvilosidades em água doce (B) e região rectangular alargada por ausência de microvilosidades em água do mar (C). As IMRC estão presentes em A e ausentes em B. Barras de escala: 30 μ m.

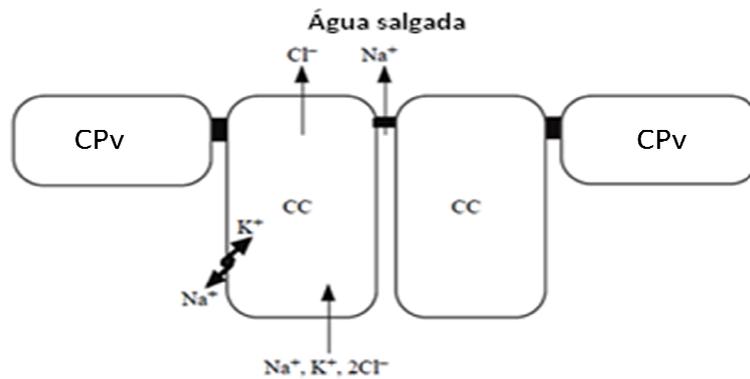


Fig. 19 – Modelo da secreção de Cl^- por Cl^- da lampreia-marinha, em água salgada (Bartels and Potter, 2004). Observam-se os vários tipos de transporte que ocorrem na BLM em água salgada: activo (seta grossa) e passivo (seta fina). As siglas CC e PC correspondem às células clorídrica e epitelial pavimentosa, respectivamente.

Ecotoxicologia e biomarcadores

A ecotoxicologia pode ser definida como o estudo dos efeitos prejudiciais, causados pela presença de substâncias químicas no ecossistema, incluindo o comportamento dessas substâncias e as transformações operadas no meio assim como os efeitos destas sobre os organismos vivos (Walker *et al.*, 1996). Diversos poluentes ou contaminantes causam efeitos que podem ser subletais ou mesmo letais nos organismos (Rand, 1995).

Regra geral, a poluição aquática ocorre de forma crónica, mediante a presença de concentrações subletais de poluentes ao longo do tempo e, tal facto, promove com maior frequência alterações estruturais e/ou funcionais nos peixes e outros animais aquáticos do que mortalidade em massa (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). Essas modificações morfo-funcionais têm sido frequentemente utilizadas como biomarcadores, permitindo indicar a exposição e o conhecimento dos efeitos nos animais de determinados poluentes ambientais (Martinez e Sousa, 2002; Almeida *et al.*, 2005).

Um biomarcador é definido como uma medida quantitativa de uma alteração nas respostas biológicas a nível molecular, celular, fisiológico ou comportamental e pode ser interpretado como resposta à exposição e/ou aos efeitos tóxicos de compostos químicos presentes no ambiente (Peakall, 1994; Cajaraville *et al.*, 2000; Lam e Gray, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003). Destas medidas, as que se processam ao nível bioquímico, como por exemplo a indução ou inibição de enzimas e/ou sistemas de enzimas bem como as funções associadas (Rand, 1995), são as que revelam significado ecológico, sendo muito sensíveis em relação a certos compostos tóxicos. Permitem uma identificação antecipada de efeitos adversos em níveis superiores de organização biológica e podem ser utilizados preventivamente em avaliações de qualidade ambiental de modo a iniciar estratégias de bio-remediação antes do aparecimento de danos irreversíveis (Cajaraville *et al.*, 2000; Monserrat *et al.*, 2007; Viarengo *et al.*, 2007). Baseando-se no princípio de que “os efeitos produzidos pelos contaminantes podem ser precocemente detetados a níveis inferiores de organização biológica”, os biomarcadores indicam se o organismo esteve exposto a contaminantes (biomarcadores de exposição) e/ou a magnitude de resposta do organismo ao composto e seus metabolitos (biomarcadores de efeito ou *stress*). (Schlenk *et al.*, 1998; Cajaraville *et al.*, 2000; Zorita *et al.*, 2008).

Os biomarcadores de efeito correspondem a alterações biológicas que ocorrem nos organismos, causadas por contaminantes, e elucidam os aspetos qualitativos da identificação do contaminante esclarecendo os mecanismos prováveis de ação. Este conceito baseia-se no facto dos efeitos serem tipicamente manifestados em níveis inferiores de organização biológica, antes de as perturbações serem percebidas ao nível da comunidade populacional. Podem, no entanto, ser medidos em qualquer ponto ao longo dos crescentes níveis organizacionais, desde o molecular ao ecossistema, variando bastante na sua especificidade (Schlenk *et al.*, 1998; Lam e Gray, 2003). Observações que envolvam alterações num nível de organização mais complexo também têm sido utilizadas como biomarcadores de respostas a nível celular e tecidual.

Os biomarcadores de exposição correspondem a alterações que indicam a exposição a um agente específico, ainda que estas variações possam não ser diretamente ligadas a efeitos adversos/tóxicos no organismo alvo. O

principal objetivo destes biomarcadores é estimar a dose interna ou biodisponibilidade de um xenobiótico no organismo, fornecendo estimativas quantitativas e qualitativas de exposição. Estes biomarcadores deverão ser respostas bem caracterizadas que levem em consideração a dinâmica biológica do organismo e as propriedades físico-químicas do agente. Um grande número de biomarcadores relacionados com a exposição a poluentes tem sido proposto para avaliar a saúde em peixes (Adams *et al.*, 1990; Van der Oost *et al.*, 2003) como por exemplo biomarcadores bioquímicos, endócrinos, metabólicos, hematológicos, iónicos e histopatológicos.

Nos peixes, os poluentes podem ser absorvidos por quatro vias nomeadamente, via alimentar, ingestão de água, branquial e através da pele, sendo a via branquial e a via alimentar as principais. Uma vez incorporados, os poluentes podem ser acumulados em vários órgãos com especial destaque para as brânquias, fígado, e músculo. A nível do fígado muitos poluentes são metabolicamente transformados, para que possam ser posteriormente eliminados via pele, intestino, rim ou brânquias (Heath, 1987).

Biomarcadores bioquímicos

As brânquias são um órgão alvo para os poluentes devido ao facto de se encontrarem em contacto permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial lamelar vasta (Poleksic e Mitrovic-Tutundzic, 1994). O efeito de determinados poluentes sobre a estrutura branquial e consequentes alterações histopatológicas são usados como indicadores sensíveis de contaminação aquática (Schwaiger *et al.*, 1997; Karan *et al.*, 1998; Coutinho e Gokhalr, 2000; Mazon *et al.*, 2002).

Eventos moleculares e bioquímicos decorrentes da exposição a agentes tóxicos tendem a ser mais sensíveis, menos variáveis e mais conservadores do que parâmetros determinados a nível orgânico (Adams *et al.*, 1990). De entre os biomarcadores bioquímicos, os mais extensivamente investigados são os enzimas sujeitos a situações de *stress*, por exemplo envolvidos na biotransformação de xenobióticos e seus metabolitos ou na defesa antioxidante (Van der Oost *et al.*, 2003) bem como análises de isolamento e caracterização de constituintes celulares de determinados tecidos e/ou componentes de órgãos que relatam *per se* as alterações metabólicas decorrentes da ação de fatores externos ambientais. A quantificação de componentes como os lípidos totais e colesterol e a determinação de perfis de AGs membranares são ferramentas fundamentais na averiguação da integridade das membranas biológicas e das suas funções (Van der Oost *et al.*, 2003).

Atividade enzimática – Na⁺/K⁺-ATPase

As Adenosinas trifosfatos (ATPases) constituem um complexo conjunto de sistemas proteicos, com atividade enzimática, encontrados em invertebrados e vertebrados (Carfagna *et al.*, 1996), desempenhando um papel crucial nas funções fisiológicas celulares como transdutores energéticos por acoplamento de reações químicas (Takao, 1985). Todas as ATPases requerem iões Na⁺, K⁺, Mg²⁺ e Ca²⁺ para a sua atividade e estão envolvidas na hidrólise/clivagem de ATP em ADP/AMP e fosfato inorgânico (Pi) com libertação de energia (Begum, 2001).

A bomba de sódio e potássio, denominada Na^+/K^+ -ATPase (E.C.3.6.1.37), pertence à família das ATPases do tipo P, envolvida no transporte de catiões, caracterizada pela formação de um intermédio fosforilado durante o ciclo catalítico (Kaplan, 2002; Horisberger, 2004). A Na^+/K^+ -ATPase é um heterodímero formado por três subunidades (α , β , γ). A subunidade catalítica α (110 kDa) possui pontos de ligação para o Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , ATP e para um inibidor específico denominado ouabaina mas, julga-se que a subunidade γ (9 kDa) pode também estar envolvida no sítio de ligação a este inibidor. A subunidade β , menor e com massa molecular de 55 kDa, não possui ponto de ligação, assim com a γ , mas é importante na localização e inserção do enzima na membrana (Figura 20) (Blanco *et al.*, 1995; Therien e Blostein, 2000; Lin *et al.*, 2004; Morrison *et al.*, 2006).

Esta enzima integral de membrana celular acopla a hidrólise do fosfato γ do ATP, ao transporte de dois iões K^+ para o meio intracelular e três iões Na^+ para o meio extracelular (Kaplan, 2002; Jorgensen *et al.*, 2003; Horisberger, 2004). Assim, estas bombas utilizam a energia armazenada sob a forma de ATP e transportam iões através das membranas contra os seus gradientes de concentração (Kaplan, 2002; Horisberger, 2004).

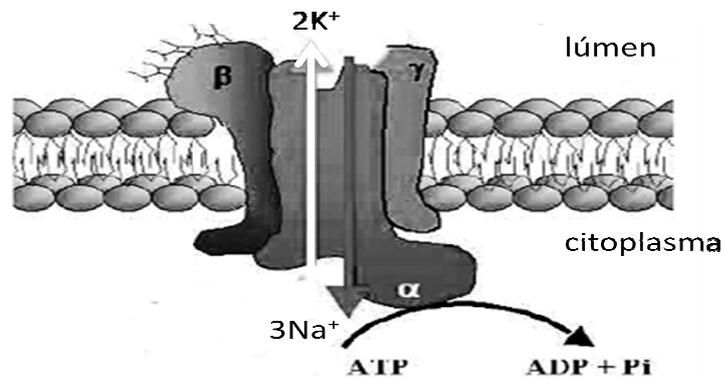


Fig. 20 – Transportador iónico Na^+/K^+ -ATPase (adaptado de Watson e Barcroft, 2001).

A diferença de concentrações de Na^+ e K^+ que caracteriza os meios extra e intracelulares é mantida através do transporte ativo efetuado pela Na^+/K^+ -ATPase eletrogénica obtendo energia pela clivagem de ATP produzindo deste modo um gradiente elétrico, responsável pelo potencial de membrana e gradiente iónico. Durante este transporte de iões, o enzima apresenta, então, duas conformações: a fosforilada (E1 – ATP ligado ao sítio ativo) e a não fosforilada (E2). A E1 tem elevada afinidade pelo Na^+ intracelular e a E2 tem elevada afinidade pelo K^+ extracelular. A alteração entre E1 e E2 resulta no transporte de três iões Na^+ para o meio extracelular e o transporte de dois iões K^+ para o meio intracelular (Figura 21), sendo usada energia sob forma de uma molécula de ATP. O ião de Mg^{2+} serve co-fator na fosforilação do enzima (Horisberger, 2004).

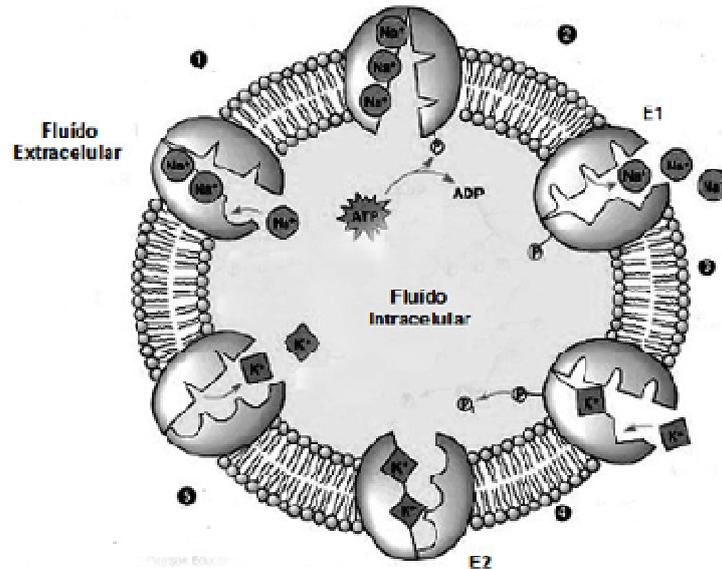


Fig. 21 – Modelo de funcionamento do transportador iônico Na^+/K^+ -ATPase (adaptado do Cummings, 2010).
 Legenda: (1) Uma molécula de ATP e três íons Na^+ ligam-se ao sítio activo do enzima, (2) fosforilação do enzima pelo ATP seguido de uma mudança conformacional (E1) expondo os íons Na^+ para a superfície extracelular, (3) libertação dos íons de Na^+ e ligação de dois íons K^+ extracelulares, (4) desfosforilação do enzima mudando a conformação para E2 e (5) captação dos íons K^+ para o meio intracelular.

A ouabaína é glicosídeo cardiotónico que inibe especificamente a atividade catalítica e o transporte iónico da Na^+/K^+ -ATPase (Croyle *et al.*, 1997; Crambert *et al.*, 2004). Ao interagir com a porção extracelular da Na^+/K^+ -ATPase, a ouabaína liga-se com a maior afinidade para a forma E2 (Paula *et al.*, 2005). Este enzima é o único recetor fisiológico conhecido para a ouabaína, estando este recetor localizado do lado extracelular desta proteína transmembranar, muito próximo ao sítio de ligação do K^+ , tornando esta ligação como lenta (Figura 22) (Qiu *et al.*, 2003).

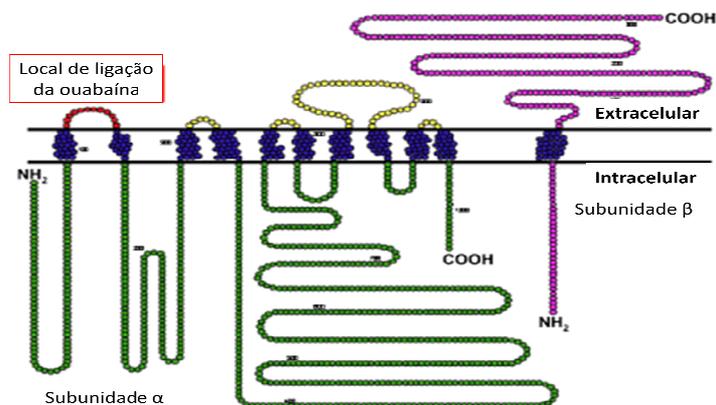


Fig. 22 – Topologia do complexo enzimático Na^+/K^+ -ATPase na membrana celular e o local de ligação da ouabaína (Blanco e Mercer, 1998).

Os processos de íono e osmo regulação em de animais aquáticos estão dependentes de enzimas de membrana que transportam iões e a variação da sua atividade pode ser usada na monitorização do impacto de um determinado poluente no organismo animal (Cotou *et al.*, 2001). Por exemplo, em peixes de água doce, esta é responsável pela manutenção de uma menor concentração iónica intracelular relativamente ao meio extracelular (Skou, 1988). Na medida em que a atividade da Na^+/K^+ -ATPase é regulada por diferentes mecanismos, esta é um enzima vulnerável a diversos poluentes, os quais podem assim alterar a sua atividade quer por interrupção da produção de energia afetando vias metabólicas quer interagindo diretamente sobre o enzima (Sancho e Ferrando, 1997; Agrahari e Gopal, 2008). Assim a determinação da atividade das ATPases, especificamente das Na^+/K^+ -ATPases, pode ser usada como indicador de variações fisiológicas e toxicológicas, em presença de poluentes (Monserrat *et al.*, 2007; Agrahari e Gopal, 2008; Lança *et al.*, 2015).

Lípidos de membrana: lípidos totais, perfil de ácidos gordos e colesterol total

Os lípidos caracterizam-se pelas propriedades homeostáticas, quer ao nível do isolamento térmico e depósito de reservas energéticas, quer na estrutura das membranas biológicas através dos fosfolípidos e esteróis, ou ao funcionarem como cofactores enzimáticos, transportadores de eletrões, agentes emulsionantes, hormonas e mensageiros intracelulares (Berg *et al.*, 2002).

A preservação das funções das membranas biológicas é um desafio muito importante devendo a integridade destas ser mantida para que possa funcionar como uma barreira seletiva eficiente entre os meios extra e intracelular (Crockett e Hazel, 1995). Da mesma forma, a adaptação homeoviscosa que permite a fluidez das membranas tem sido observada na maior parte dos animais vertebrados. Em diversas situações, verifica-se que as membranas reestruturam os seus fosfolípidos de forma a garantirem a estabilidade das suas funções. Um estudo revelou que os organismos conseguem ajustar a fluidez das membranas mediante a modificação de proporções de combinações específicas de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) (ligados na posição *sn-1*) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA) (ligados na posição *sn-2*) de certas moléculas de fosfolípidos tais como fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina (Arts e Kohler, 2008).

Atualmente, as membranas já não são consideradas misturas homogéneas de proteínas e lípidos mas sim domínios bem caracterizados de PUFAs e *rafts* de membrana ricos em colesterol, sabendo-se que este último interatua com os fosfolípidos de forma a moderar a fluidez membranar, ou seja, quer os fosfolípidos quer o colesterol apresentam influência na ordem de membrana (Arts e Kohler, 2008). Por outro lado, sabe-se que as reestruturações de lípidos na constituição das membranas que são induzidas em presença de certos fatores abióticos tais como temperatura, salinidade, pressão, entre outros, podem ter influência em numerosas proteínas integrais de membrana e nas suas funções, sendo de destacar a Na^+/K^+ -ATPase (Grisham e Barnett, 1973; Kimelberg e Papahadjopoulos, 1974; Gibbs e Somero, 1990; Crockett, 1999; Bystriansky e Ballantyne, 2007; Arts e Kohler, 2008; Bradley, 2009).

Sabe-se que perante variações ambientais como sejam a temperatura ou mesmo a osmolaridade do meio extracelular existem modificações significativas na estrutura lipídica das membranas celulares e o

“comportamento” destas bicamadas fosfolipídicas pode alterar-se para um estado de rigidez (em presença de baixas temperaturas e hiperosmolaridade) para um estado de fluidez (em presença de elevadas temperaturas e situações de hipo osmolaridade) (Hazel, 1995).

A dependência da fluidez de membranas biológicas está também documentada em relação ao tipo de AGs e grau de insaturação dos mesmos que constituem os fosfolípidos membranares, sendo o papel desempenhado pelos MUFAs distinto do desempenhado pelos PUFA. Estes últimos são importantes na medida em que as suas duplas ligações conferem um maior movimento ao longo das cadeias hidrocarbonadas mas mantêm o estado dinâmico da bicamada fosfolipídica e condições de permeabilidade que sejam compatíveis com as funções biológicas (Hazel, 1995). Esta situação não é similar à proporcionada pelas cadeias hidrocarbonadas dos MUFA, que em virtude à sua configuração geométrica não conseguem formar cadeias alinhadas regularmente e este facto altera a permeabilidade das membranas (Hazel, 1995).

Um estudo referiu que o colesterol desempenha um papel relevante na modulação da atividade do enzima Na^+/K^+ -ATPase, sendo muitas vezes mencionado que a máxima atividade em células renais de bovino é alcançada com concentrações intermédias deste lípido (ref). Um estudo em epitélio intestinal de truta revelou que mesmo dentro dos níveis fisiológicos de colesterol presentes nas membranas basolaterais, a atividade da Na^+/K^+ -ATPase é máxima na presença de níveis mais baixos de colesterol (Crockett e Hazel, 1997).

Desta forma, compreende-se que a determinação dos lípidos totais presentes, os perfis de AGs e o teor de colesterol nas membranas biológicas sejam marcadores importantes na medida em que interferem com o meio onde se encontram integradas numerosas proteínas membranas com destaque para a Na^+/K^+ -ATPase.

Biomarcadores histopatológicos

A histopatologia tem sido uma metodologia fundamental para ajudar na quantificação dos efeitos causados pela toxicidade de inúmeras substâncias e misturas complexas em órgãos alvo e nos mecanismos de ação de alguns contaminantes (Schwaiger *et al.*, 1997; Wester *et al.*, 2002) sendo as alterações histológicas decorrentes da exposição a xenobióticos utilizadas como biomarcadores (Heath, 1987; Schwaiger *et al.*, 1997; Martinez e Sousa, 2002; Wester *et al.*, 2002; Van der Oost *et al.*, 2003).

As alterações histopatológicas medidas em determinados tecidos de organismos expostos a xenobióticos ou medidas da condição dos indivíduos (crescimento, reprodução, etc.), representam biomarcadores intermédios sensíveis e permitem uma pertinente avaliação do estado e atividade fisiológica dos organismos (Pampanin *et al.*, 2005; Viarengo *et al.*, 2007; Ketata *et al.*, 2008).

Na medida em que as brânquias são vitais em diversos processos tais como respiração, osmorregulação, equilíbrio iónico e excreção de azoto (Heath, 1995), a análise da sua histomorfologia tem sido útil como marcador biológico (Hazel, 1995; Schwaiger *et al.*, 1997; Harper e Wolf, 2009; Ogundiran *et al.*, 2009; Flores-

Lopes e Thomaz, 2011). Todavia convém referir que as alterações morfológicas nas brânquias podem representar estratégias adaptativas para a manutenção de algumas funções biológicas quando o organismo animal está em presença de alterações em determinados parâmetros do meio (Laurent e Perry, 1991). Deste modo, as alterações morfológicas e histopatológicas são complementares e são frequentemente utilizadas como biomarcadores que permitem inferir o estado de saúde dos organismos face à exposição a xenobióticos (Schwaiger *et al.*, 1997; Wester *et al.*, 2002).

Mallatt (1985) realizou um levantamento sobre os tipos de modificações das brânquias mais características face a determinados agentes químicos e físicos que ocorrem frequentemente no meio ambiente. Considerando as regiões interlamelar e lamelar, as alterações morfológicas mais frequentes são o descolamento epitelial, hipertrofia das células epiteliais, ruptura de células epiteliais, fusão lamelar, hiperplasia lamelar por crescimento celular, aneurisma lamelar, proliferação de células mucosas e clorídricas, proliferação de células mucosas, congestão (alteração do espaço sanguíneo delimitado pelas células pilares), infiltração de leucócitos no epitélio (edema) e necrose, estando algumas destas alterações ilustradas na Figura 23 (Machado, 1999).

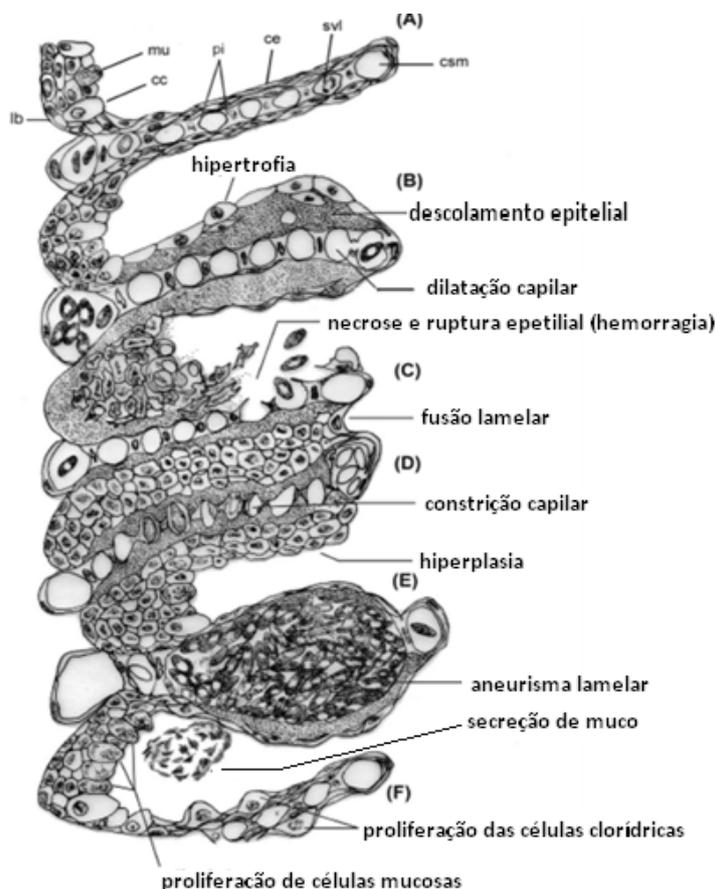


Fig. 23 – Constituição do epitélio branquial (A) e lesões histológicas mais comuns (B - F), induzidas por substâncias tóxicas (Machado, 1999, modificada de Mallat, 1985). A abreviatura lb corresponde à lamina basal, cc à célula clorídrica, mu à célula mucosa, pi à célula pilar, ce à célula epitelial lamelar, svl ao seio venoso lamelar e csm a um canal sanguíneo marginal.

O espessamento do epitélio filamentar e principalmente lamelar observado em estudos efetuados em peixes expostos a diferentes poluentes (Arellano *et al.*, 2000) pode ser devido à proliferação de CCs e de células indiferenciadas (Dang *et al.*, 1999). O edema intersticial, o descolamento epitelial, a proliferação do epitélio filamentar e a fusão de lamelas são alterações histológicas que, muitas vezes, funcionam apenas como mecanismos de defesa, na medida em que diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1985; Erkmen e Kolankaya, 2000). Essas respostas dificultam o acesso do poluente ao sangue mas vão dificultar a realização de trocas gasosas (McDonald e Wood, 1993; Fernandes e Mazon, 2003).

Por sua vez, as dificuldades respiratórias podem ser responsáveis pela indução da vasodilatação. A vasodilatação do eixo vascular das lamelas conduz, por vezes, à rutura das células pilar com perda da sua capacidade de suporte, levando ao aparecimento dos aneurismas lamelares (Fernandes-Castilho *et al.*, 2007).

A necrose e a rutura do epitélio branquial são lesões que refletem o efeito direto dos poluentes (Temminck *et al.*, 1983) e que ocorrem em condições de maior contato (Abel, 1976). A degenerescência por necrose e apoptose das células do epitélio branquial, essencialmente CCs e CPvs também são observadas em estudos de natureza ultra-estrutural realizados em teleósteos expostos a diferentes poluentes (Pratap e Wendelaar Bonga, 1993; Mazon *et al.*, 2002).

Xenobiótico atrazina

O herbicida atrazina, 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilano-1,3,5-triazina (Nº CAS 1912-24-9; PubChem 2256, Figura 24), pertence ao um grupo de químicos denominado triazínicos cuja estrutura apresenta um anel heterocíclico clorado e N-alquilado que confere à molécula uma elevada resistência à degradação biológica (Howard, 1991; Solomon *et al.*, 2008).

A atrazina (ATZ) foi comercializada pela primeira vez na década de 1950 e, devido ao seu uso intensivo em práticas agrícolas durante anos, ainda hoje é o herbicida mais detetado em ensaios de monitorização de ecossistemas aquáticos, particularmente em águas subterrâneas e de superfície (Cerejeira *et al.*, 2003; Van der Oost *et al.*, 2003; Hostovsky *et al.*, 2014), embora atualmente esteja proibida a sua utilização em várias zonas do globo.

Desde a década de 90 que a ATZ é um composto regulamentado tendo sido estabelecidos limites máximos para a sua deteção em águas de consumo da ordem dos $3 \mu\text{gL}^{-1}$ nos Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, USEPA) e $0,1 \mu\text{gL}^{-1}$ na União Europeia (Conselho da União Europeia, UE). Na Europa a deteção de ATZ em águas de consumo em níveis superiores aos limites máximos estipulados pelo Conselho da UE levou a que a utilização fosse proibida em alguns países, como é o caso da França, Dinamarca, Finlândia, Alemanha, Áustria e Itália. Em consequência de uma reavaliação dos riscos ecotoxicológicos, o Conselho da UE revogou a autorização das formulações fitofarmacêuticas que contêm ATZ (Diretiva 2004/248/CE do Conselho

de 10 de Março de 2004), uma vez que estas proporcionavam um elevado risco de contaminação das águas subterrâneas por ATZ caso os produtos resultantes da sua degradação excedessem concentrações de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

Em quatro Estados-Membros da União Europeia (Portugal, Espanha, Reino Unido e Irlanda) foi concedida uma prerrogativa à diretiva comunitária (Diretiva 2004/248/CE do Conselho de 10 de Março de 2004), autorizando-se o uso de ATZ até ao final do ano de 2007. De acordo com a prerrogativa concedida à diretiva comunitária, a ATZ ainda fez parte da lista de produtos com venda autorizada até 2007, sendo comercializada simples ou em mistura com outros herbicidas, sob várias designações comerciais (*Primextra^{RS} Gold*, *Gesaprime^R*, *Graminex^{RA}*, entre outras) e para aplicação exclusiva em culturas de milho.

Em Portugal e devido ao anteriormente exposto, a ATZ ainda é um dos pesticidas frequentemente detetados em águas superficiais e subterrâneas de regiões agrícolas o que estabelece a sua pesquisa anualmente em águas destinadas ao consumo humano, ao abrigo do Decreto de Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto (DGAV, 2014), estando ainda, o uso de pesticidas na agricultura dependente atualmente dos registos fixados pelos órgãos competentes - Ministério da Saúde (MS), do Ministério da Agricultura e Desenvolvimento Rural e das Pescas - e regendo-se pelas Diretivas e Normas vigentes na Comunidade Europeia. Os órgãos competentes, acima citados expressam-se através dos Regulamentos (CEE) 2092/91 e Regulamento (CEE) 2078/92 (DGAV, 2014).

As concentrações de ATZ ainda hoje encontradas no meio ambiente são extremamente variáveis e, como é altamente persistente no meio, tornou-se um contaminante de solos, águas superficiais e águas subterrâneas (Brodeur *et al.*, 2009). Quantidades significantes de ATZ podem permanecer acumuladas no solo dependendo do tipo de solo, da percentagem de matéria orgânica, do teor de argila, do pH e estrutura do mesmo. Há cinco principais processos de degradação da ATZ no ambiente: hidrólise, adsorção, volatilização, fotólise e degradação biológica (Graymore *et al.*, 2001). A salinidade do solo também pode influenciar na degradação, já que os solos mais salinos possuem uma diminuição da comunidade microbiológica (Lin *et al.*, 2008).

Na água, a ATZ é muito resistente à degradação microbiológica sendo a principal via de degradação a hidrólise, uma vez que a fotólise não ocorre em comprimentos de onda superiores a 300 nm (Howard, 1991; Winkelmann e Klaine, 1991; Solomon *et al.*, 2008). A média de vida da ATZ na água é de 41 a 237 dias, no sedimento entre 58 a 547 dias e por dissipação no campo de 8 a 99 dias (Novartis, 2000; Giddings *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2008). Em virtude do movimento de ATZ ocorrer principalmente em fase aquosa uma grande quantidade é perdida dos solos para águas superficiais e subterrâneas através de lixiviação. As concentrações de ATZ nas águas oscilam entre concentrações elevadas superiores a $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ em corpos de águas adjacentes a terrenos cultivados até concentrações reduzidas da ordem dos $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Readman *et al.*, 1993; Schottler *et al.*, 1994; Graymore *et al.*, 2001). Normalmente, as concentrações de ATZ encontradas em corpos de água rondam os $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Nwani *et al.*, 2010) e nas águas de precipitação verificam-se concentrações mais baixas. Hall (1993) relatou a presença de 445 ng.L^{-1} de ATZ em água da chuva obtida em Ontário (Canadá) (Hall *et al.*, 1993). A presença de ATZ em água da chuva é uma consequência do processo de volatilização durante a aplicação deste herbicida nos solos (Solomon *et al.*, 2008).

Em ecossistemas estuarinos e de águas costeiras, a presença de ATZ é relativamente baixa devido à diluição e degradação (Graymore *et al.*, 2001) e ainda devido ao facto de ser atualmente proibido o seu uso. Em Portugal, existem alguns estudos em algumas bacias hidrográficas onde foram detetadas concentrações elevadas de ATZ e especificamente no rio Estorãos cujo valor é da ordem dos 0,05 µg.L⁻¹ (Quadro 2).

Quadro 2 – Valores de concentração de ATZ detetados em águas superficiais em Portugal.

Quantidade ATZ (µg.L ⁻¹)	Rios	Data	Referência
0,05-28,89	Tejo-Ribatejo	1996-1998	(Batista <i>et al.</i> , 2000)
0,05-6	Tejo-setúbal	1991-1998	(Cerejeira <i>et al.</i> , 2003)
>0,5	Guadiana	2009	(Pérez <i>et al.</i> , 2009)
0,12	Douro	2007	(ADP, 2007)
0,05	Coura	2010	(Snirh, 2012)
0,05	Estorãos	2010	(Snirh, 2012)

Os principais produtos de degradação da ATZ são desetilatrazina (DEA), hidroatrazina (HA), desisopropilatrazina (DIA), diaminocloroatrazina (DACT), desetihidroxiatrazina (DEHA) e desisopropihidroxiatrazina (DIHA) (Figura 24).

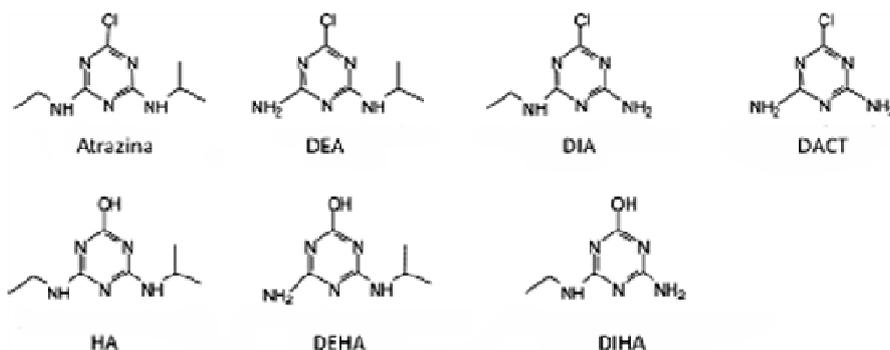


Fig. 24 – Estrutura química da ATZ e seus principais metabolitos (Solomon *et al.*, 2008).

Pode assim afirmar-se que a molécula de ATZ é altamente persistente no meio ambiente devido à degradação lenta por hidrólise, à elevada capacidade de absorção pelas moléculas orgânicas e argila, baixa pressão de vapor, elevado potencial de escoamento/lixiviação e carácter hidrofílico, e apresenta ainda moderada solubilidade em água. Como a contaminação de corpos de água é inevitável principalmente em águas subterrâneas próximas de zonas agrícolas (Coutinho *et al.*, 2005), riachos, lagos e lagoas que tenham ligação com o lençol freático, o potencial de exposição aos organismos aquáticos continua a ser elevado.

Em vertebrados aquáticos, efeitos letais e subletais provocados pela ATZ são estudados desde a década de 70 (Peters e Cook, 1973; Eisler, 1989), relatando diversos estudos que os impactos significativos podem ocorrer na presença de baixas concentrações mas cujos períodos de tempo de exposição sejam longos (Graymore *et al.*, 2001).

Para os peixes, a concentração letal varia entre 3 – 100 mg.L⁻¹, (Giddings *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2008), enquanto os efeitos subletais podem ocorrer em presença de concentrações inferiores a 2 mg.L⁻¹ e perante a exposição prolongada conduzindo a alterações em vários tecidos (Neskovic *et al.*, 1993). Todavia, o estado fisiológico e o comportamento de peixes podem ser afetados pela ATZ mesmo em concentrações da ordem dos 3 µg.L⁻¹ (Chapman e Stranger, 1992; Davies *et al.*, 1994; Graymore *et al.*, 2001), resultando esses efeitos tóxicos em alterações bioquímicas, morfológicas e fisiológicas dos tecidos (Heath, 1987). Em contrapartida, a ATZ não tem tendência a provocar bioacumulação pelo facto de ser rapidamente metabolizada (Solomon *et al.*, 2008), o que confere, de certa forma, uma proteção a nível das teias alimentares.

Capítulo 3: Metodologia

Estratégia

Local de realização	O trabalho de campo efetuou-se na bacia hidrográfica do Rio Lima. O trabalho laboratorial decorreu entre o Centro de Ciências do Mar e do Ambiente (MARE), na Universidade de Lisboa, e os laboratórios de Enologia e Tecnologia e Qualidade dos Produtos Regionais do Pólo da Mitra, Universidade de Évora.
Tempo de realização	6 Meses, com início em Outubro de 2014 e fim em Março de 2015
Modelo biológico	Lampreia-marinha (<i>Petromyzon marinus</i> L.)
Dimensão da amostra	120 Juvenis de lampreia-marinha
Amostragem	Indivíduos capturados durante a migração trófica no afluente Estorãos do rio Lima
Tecido	Tecido branquial
Métodos laboratoriais	Extração de LTs da BLM das CCs do tecido branquial pelo método ASE; transesterificação dos lípidos polares pelo método de Morrison and Smith (Morrison e Smith, 1964); Identificação do perfil em AGs por cromatografia de partição gás-líquido (Lança <i>et al.</i> , 2011); quantificação do CT dos LT recorrendo a ELISA; quantificação da PT da BLM, pelo método de Lowry modificado (Lowry <i>et al.</i> , 1951), e determinação da atividade do enzima Na ⁺ /K ⁺ -ATPase, por método espectrofotométrico e na presença de ouabaína (Parvez <i>et al.</i> , 2006); análise histomorfológica do tecido branquial e determinação do grau de severidade das lesões seguindo a metodologia do índice histopatológico proposto por Bernet (Bernet <i>et al.</i> , 1999).
Tratamento de dados	Análise de variância (ANOVA I) e análise discriminante múltipla (MDA) pelo programa estatístico IBM SPSS 20.

Organigrama

Em seguida encontra-se um diagrama que resume através da representação esquemática o delineamento experimental (Figura 25).

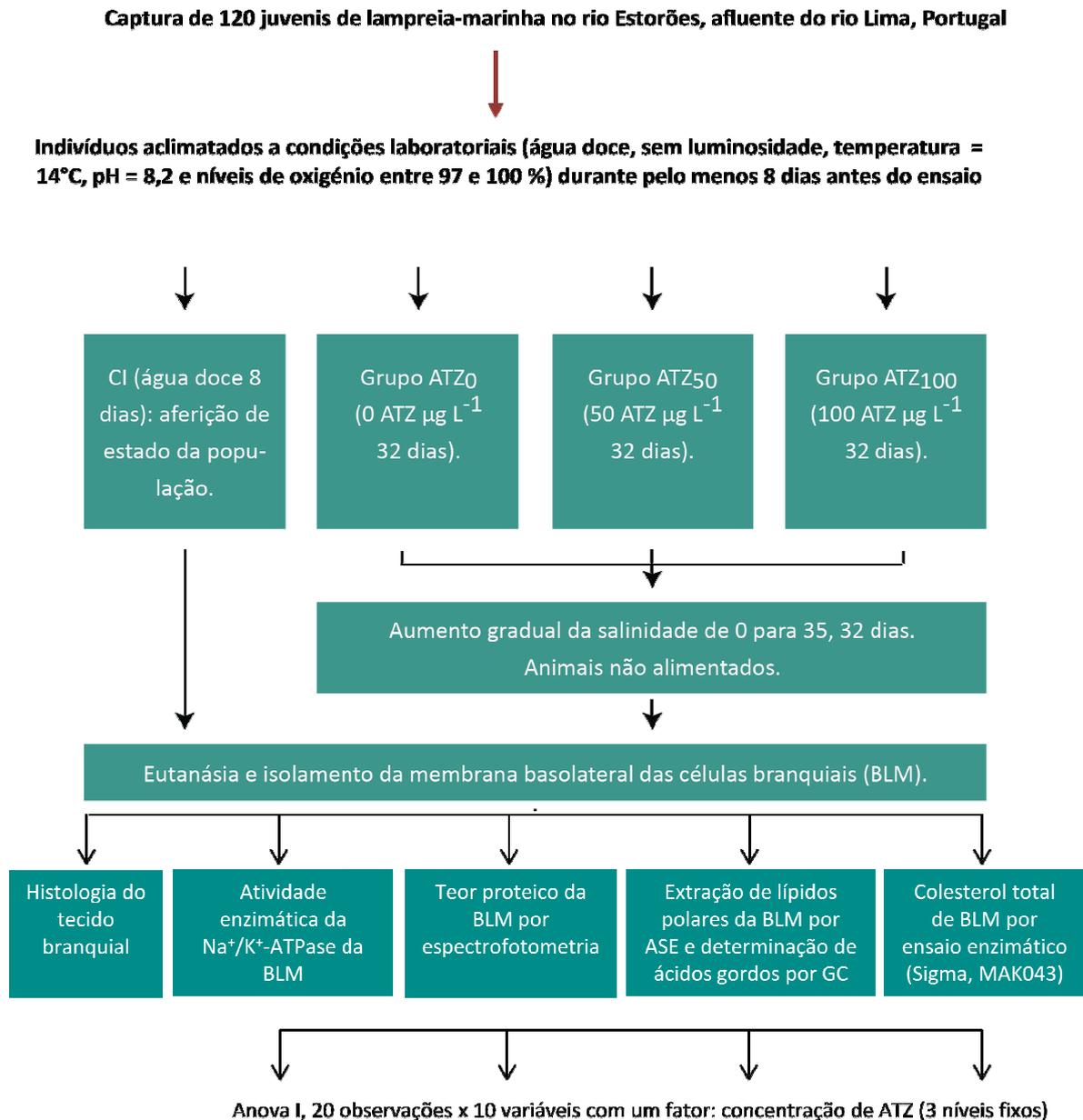


Fig. 25 – Delineamento experimental para avaliação de biomarcadores em BLM de brânquias de juvenis de lampreia-marinha expostos a diferentes concentrações de ATZ.

(Os procedimentos de eutanásia e isolamento da BLM foram efetuados por outros membros da equipa).

Procedimento experimental

Procedimentos éticos

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações sobre ética e bem-estar animal presentes no Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da União Europeia - em Portugal representado pelo Decreto-Lei nº 129/92, Portaria nº 1005/92 transposto para o Decreto-Lei nº 113/2013. Este trabalho foi praticado sob uma licença institucional (Fluviário de Mora) para a experimentação animal e supervisionado pela orientadora sob licença pessoal emitido pela Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV, 2014), Português Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas.

Captura e eutanásia

Em 2012, durante o mês de Outubro, foram capturados através de pesca elétrica (Hans Grassl EL 62 generator DC, 600 V), 120 juvenis de lampreia-marinha no rio Estorãos, afluente do rio Lima (41° 40'N; 08° 50'O), por outros membros do projeto experientes neste tipo de processo de forma a minimizar o *stress* de captura. Este período corresponde à época do ano em que estes animais terminam a metamorfose e se preparam para fazer a migração trófica em direção ao mar.

Após a sua captura, os juvenis foram transportados vivos em tanques de polietileno com cerca de 0,4 m³ de capacidade, equipados com bomba arejadora e suporte de vida adequado, incluindo filtro biológico, refrigerador e oxigenador (Figura 26). Durante o período de permanência na sala de experimentação animal, no Fluviário de Mora, ficaram instalados em tanques igualmente equipados com um sistema de suporte de vida adequado, incluindo filtro biológico, refrigerador e oxigenador.

Inicialmente todos os animais foram colocados num tanque de 300 L durante 7 dias (período de aclimação às condições laboratoriais). Os animais permaneceram no tanque a uma temperatura constante de 14°C, e com 0 de salinidade, pH = 8.2, oxigenação entre 97 e 100 % e foram mantidos num ambiente com ausência de luz, a fim de evitar comportamentos de fototaxia. Foram monitorizados os parâmetros químicos e físicos da água e os animais não foram alimentados. Foi igualmente monitorizada a atividade diária e feito o registo de eventual mortalidade. Para os tanques onde foi feito incremento de salinidade, esta foi preparada dissolvendo o sal sintético comercial (Coral Pro Sal, Red Sea) em água doce.



Fig. 26 – Sistema de suporte de vida e aquário de 300 L localizados no Fluviário de Mora. Para fins fotográficos os animais foram expostos à luz na sua chegada no início do ensaio.

No fim deste período, foram retirados aleatoriamente 25 animais (Grupo Controlo Inicial, CI), insensibilizados pelo frio, eutanasiados (decapitação) e analisados logo a seguir. Os restantes 75 animais foram distribuídos de forma aleatória por três tanques de 100 L de capacidade que constituíram os grupos experimentais: tanque de Grupo ATZ₀, tanque com concentração 50 µg.L⁻¹ de ATZ na água (Grupo ATZ₅₀) e o tanque com concentração 100 µg.L⁻¹ de ATZ na água (Grupo ATZ₁₀₀). Os animais permaneceram nestes tanques durante 32 dias, sendo sujeitos a um aumento gradual de salinidade e findo este período foram igualmente insensibilizados pelo frio, eutanasiados e analisados. Assim, foi estabelecido que o tanque referente ao grupo ATZ₀ os juvenis não seriam expostos à presença de ATZ na água mas eram sujeitos a um aumento gradual de salinidade dos 0 psu aos 35, durante um período de tempo de 32 dias. Nos restantes dois tanques de ATZ, os animais foram expostos à ATZ na água a uma concentração de 50 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹ respetivamente, durante o intervalo de tempo estabelecido e, em simultâneo, sujeitos ao aumento gradual de salinidade.

Os grupos experimentais ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀ foram sujeitos a um aumento da salinidade de 0 até 35 o qual seguiu um procedimento de aumento com 7 dias de intervalo. Desta forma, ao 7º, 14º, 21º e 32º dia em cativeiro a salinidade dos tanques foi gradualmente aumentada de 0 para 10, 25 e 35, respetivamente. Paralelamente a água foi monitorizada, em todos os tanques, com uma periodicidade semanal, para seguintes parâmetros: temperatura (°C), salinidade, concentração de ATZ (µg.L⁻¹), amónia (mg.L⁻¹), nitrito (mg.L⁻¹), nitrato (mg.L⁻¹) e pH (1-14).

Após 32 dias, os animais foram eutanasiados, registados os dados biométricos (massa corporal e determinação de género) e recolhido o tecido branquial (massa branquial). Em virtude desta tarefa ter sido efetuada por outra equipa do mesmo projeto, ela não é descrita nesta dissertação. Referimos apenas que no que diz respeito às brânquias, o procedimento incluiu a remoção do terceiro arco branquial para posterior análise histológica. Devido à reduzida quantidade de material biológico das brânquias, estas foram processados em *pools* de 5 animais. A única exceção a este procedimento residiu nas técnicas histológicas, em que não foram utilizados *pools* mas sim indivíduos.

Recolha dos tecidos, Lípidos e Ácidos Gordos

Tal como anteriormente referido, em virtude da obtenção da BLM ter sido efetuada por outra equipa do mesmo projeto, ela constitui o único procedimento que não é descrito nesta dissertação, menciona-se apenas que o protocolo foi adaptado do procedimento proposto por Crockett (1999) e Lança *et al.* (2005).

Extração dos lípidos totais da BLM

As extrações de lípidos totais dos homogenatos de BLM foram realizadas de acordo com o método de Folch *et al.* (1957) utilizando o ASE, um equipamento que pressuriza solventes a elevadas temperaturas para extração de componentes de amostras reduzidas. A cada uma das amostras foi adicionado agente inerte, Terra de Diatomáceas (Diatomaceous Earth, hydromatrix Varian, P/N 049458) e num almofariz de porcelana procedeu-se à sua homogeneização na presença de azoto líquido. A mistura foi colocada numa célula de extração de 11 mL, já previamente preparada com 2 filtros celulósicos e preenchida parcialmente com agente inerte. A extração foi feita a 115°C e 13.8 MPa e os solventes utilizados (60% clorofórmio/ 40% metanol) foram previamente tratados com 100 mg.L⁻¹ de BHT (3,5-Di-tert-butil-4-hidroxitolueno, Merck; Darmstadt, Germany) usado como antioxidante. Foram efetuados dois ciclos de extração estáticos de 5 minutos cada. O extrato de lípidos totais obtido foi concentrado em fluxo de azoto usando-se um rotavapor e banho acoplado (Buchi Rotavapor R-114 e Buchi waterbath B-480, Switzerland) a uma temperatura de 50°C e foi pesado para determinação da massa de lípidos totais de BLM. Em seguida cada extrato foi reconstituído em 20-30 volumes de acetona gelada e procedeu-se à separação dos lípidos em apolares e polares. Recolheu-se e pesou-se a fase superior correspondente aos lípidos apolares, para posterior determinação do colesterol total e a fase inferior, contendo os lípidos polares, foi igualmente pesada para determinação dos lípidos polares da BLM.

Transesterificação dos lípidos polares

A fase inferior (lípidos polares) foi reconstituída em 1 mL de NaOH 0.5 N a 70°C durante 20 min e os AGs preparados com triflureto de boro em metanol (BF₃) (14 g.L⁻¹ CH₃OH, Merk-Schuchardt, Germany). Na realização da transesterificação dos lípidos polares, as amostras foram submetidas ao processo de saponificação e metilação, de acordo com o método de Morrison e Smith (1964). De forma resumida, ao extrato de lípidos polares adicionou-se 1 mL de solução metanólica de NaOH 0.5 M, procedeu-se à saponificação. Após

arrefecimento adicionou-se 1 mL de BF₃ em metanol a 14% e deixou-se metilar. Após arrefecimento, parou-se a reação com água destilada e posteriormente adicionou-se 2 mL de éter de petróleo e agitou-se vigorosamente e aguardou-se pela separação de fases. Recolheu-se o sobrenadante para vial etiquetado e adicionou-se 250 µL de uma solução de concentração conhecida de padrão interno (éster metílico de C19:0). As amostras concentraram-se sob corrente de azoto. Os viais foram fechados hermeticamente e armazenados a -20°C, para posterior análise cromatográfica.

Análise cromatográfica dos ésteres metílicos dos ácidos gordos

Os ésteres de AGs, foram separados num cromatógrafo Hewlett Packard, com *software* HPChem, equipado com injetor *split-splitless* e um detetor de ionização por chama (em inglês, FID). A coluna utilizada foi uma coluna capilar Omegawax 320 (30 m de comprimento x 0.32 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme) da Supelco. A fase móvel utilizada foi hidrogénio com um fluxo de 1 mL min⁻¹, a 200°C. As condições experimentais usadas encontram-se especificadas no Quadro 3.

Quadro 3 – Condições experimentais utilizadas na análise cromatográfica.

Parâmetros	Condições
Temperatura do injetor	260°C
Temperatura do detetor FID	270°C
Temperatura inicial do forno	140°C
Temperatura final do forno	240°C
Rampa de temperatura	4°C.min ⁻¹
Fluxo de Hidrogénio	1 mL min ⁻¹
Tempo de corrida	40 min

Em paralelo, foi cromatografado um padrão externo composto FAME Mix 37 (10 mgmL⁻¹ em diclorometano), e um padrão interno, em idênticas condições experimentais.

As áreas dos picos resultantes foram corrigidas pelos fatores de resposta teóricos relativos do FID (Ackman, 2002). Os ésteres metílicos dos AGs foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção do padrão externo (Figura 27). Para cada amostra, a composição relativa de cada AG foi apresentada como a percentagem no somatório de todos os AGs identificados.

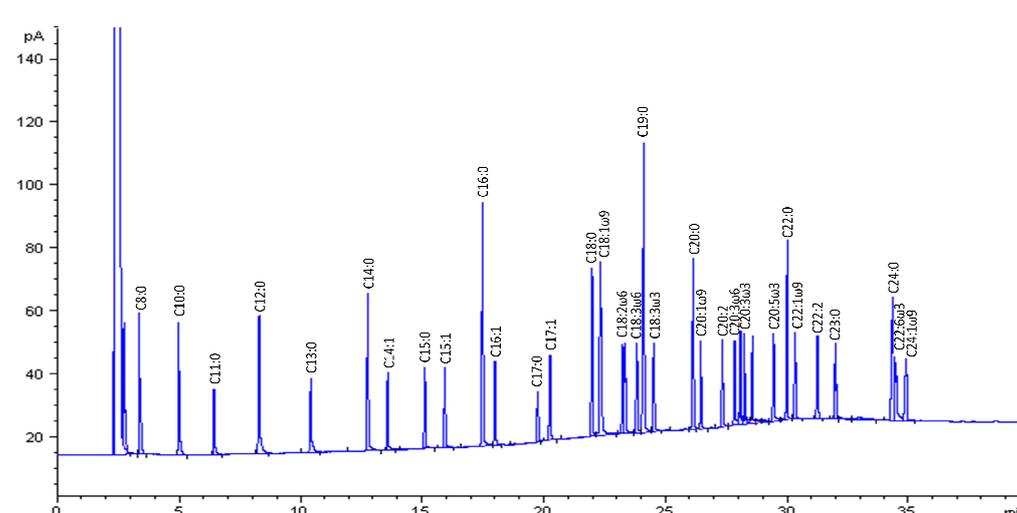


Fig. 27 – Cromatograma dos AGs do padrão FAME MIX 37 e do padrão interno C19:0.

Determinação do colesterol total da BLM

Da separação dos lípidos totais, a fase superior correspondente aos lípidos apolares foi usada para a determinação do colesterol total por espectrofotometria. Recorreu-se ao método colorimétrico Elisa (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Sigma-Aldrich, MAK043) para determinar os teores de colesterol total presente em cada pool. A concentração do colesterol da amostra foi determinada mediante a adição de um reagente cromogénico enzimático, de forma a obter-se um produto com coloração, sendo lido a 570 nm (GloMax Multi Detection System, Promega).

Determinação das proteínas totais da BLM

A concentração proteica das suspensões da BLM de tecido branquial foi determinada segundo o método de Folin-Lowry (1951) modificado e descrito por Ohnishi and Barr (1978). Previamente, as amostras foram misturadas com o Reagente de Biureto e posteriormente com o Reagente Fenólico de Ciocalteau. Leram-se as absorvências das mesmas num espectrofotómetro a 720 nm (UV Beckman DU-530), sendo as concentrações de proteína determinadas através de uma curva de calibração previamente preparada (soluções padrão de albumina (BSA – *Bovine Serum Albumin*). A concentração de proteínas foi expressa em miligramas de proteína total por grama de BLM (mg g^{-1}). O facto de diluição (FD) foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{FD} = 1000 (\text{amostra} + \text{NaOH}) / 100 \text{ amostra} = 10$$

Determinação da atividade enzimática da Na⁺/K⁺-ATPase da BLM

A atividade do enzima Na⁺/K⁺-ATPase foi medida através da libertação de fosfato inorgânico (Pi) resultante da hidrólise do ATP nas suspensões da BLM. Resumidamente, 10 µL de suspensão enzimática foi adicionada a 20 µL de meio de incubação (40 mM Tris, 80 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 mM EDTA, pH= 7.5) ou meio com inibidor enzimático (40 mM Tris, 80 mM NaCl, 8 mM MgCl₂, 10 mM ouabaína, 1 mM EDTA, pH= 7.5). Procedeu-se a pré-incubação durante 5 minutos a 37°C. A reação foi depois iniciada pela adição de 10 µL de ATP (4 mM) e incubou-se durante 30 minutos a 37°C. A reação foi parada com a adição de 200 µL de solução de Ames (1966) e procedeu-se a nova incubação durante mais 30 minutos. O Pi presente no meio de reação foi medido a um comprimento de onda de 820 nm (GlocoMax Multi Detection System, Promega) e as concentrações foram determinadas a partir da curva de calibração, utilizando como padrão 1 mM Na₂HPO₄. A atividade da Na⁺/K⁺-ATPase foi calculada pela subtração da atividade da ATPase total pela atividade da ATPase sensível à ouabaína e expressa em µmol.mg⁻¹ proteína h⁻¹ após correção com os brancos de cada ensaio utilizados para corrigir a hidrólise de ATP não enzimática.

Análise histopatológica do tecido branquial

O material biológico utilizado nesta tarefa foi preservado em álcool a 70 %. O protocolo para preparação histológica de brânquias de lampreia-marinha em parafina seguiu um procedimento em quatro etapas: fixação, corte, montagem e coloração. Apenas a primeira etapa foi realizada por outros membros da equipa, mas por uma questão de coerência de protocolo é aqui incluída.

Procedimento de fixação de brânquias

Removeu-se o terceiro arco branquial esquerdo e fixou-se em líquido de Bouin durante 24 horas. Após este período iniciou-se a desidratação sujeitando a amostra a sucessivas passagens a crescentes diluições de etanol durante intervalos de tempo definidos.

Protocolo de preparação histológica de brânquias de *P. marinus* em parafina

A. Desidratação

As secções de brânquias foram embebidas em álcool, de acordo com a seguinte cronologia: 1 hora em álcool a 70 % p/p, seguida de mais 1 hora em álcool a 70 % p/p. Depois 1 hora em álcool a 90 % p/p, novamente 1 hora em álcool a 90 % p/p e depois 1 hora em álcool a 96 % p/p. Repetiu-se mais 2 vezes a permanência no álcool a 96 % e finalmente foram colocadas durante 16 horas em álcool a 96 % p/p e parafina (solução resultante com 50% de cada um dos componentes). Procedeu-se à limpeza das brânquias e permaneceram durante 24 horas em parafina (a parafina foi endurecida com 1 ml de endurecedor para cada 15 ml de parafina).

B. Inclusão

Para a montagem das brânquias, estas foram colocadas em moldes para blocos de parafina, os quais foram preenchidos com parafina até cobrir toda a secção da brânquia. Em seguida deixou-se secar em placas a 50°C.

C. Corte

Após completa secagem dos blocos, estes foram retirados dos moldes e colados paralelepípedos de madeira. Após secagem, efetuaram-se cortes de 3 µm de espessura num micrótomo Leica RM 2155, sendo realizados 3 cortes por bloco e 2 lâminas por secção de brânquia.

D. Coloração

As preparações de cortes de cada lâmina foram banhadas num recipiente com o corante Azul de Toluidine-PAS, durante 1 minuto. Em seguida foram mergulhadas num recipiente com água para eliminar o excesso de corante. As preparações histológicas secas foram recobertas com lamelas.

Observação Microscópica

Quer para os indivíduos do grupo CI quer para os de cada grupo experimental (ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀) foram realizadas 5 a 10 preparações histológicas que foram observadas e analisadas utilizando equipamento Nikon Eclipse 600 acoplado a uma câmara digital Nikon DN100. As imagens foram digitalizadas e posteriormente cada secção foi analisada recorrendo ao *software* Leica *Application Suite* 4.1.0 (Leica Microsystems). Na observação individual de cada brânquia estipulou-se a captura de imagens correspondentes a três filamentos de brânquias completos e dez lamelas por filamento. A utilização do *software* Image, permitiu a análise e medição da área total da superfície dos clusters de CCs da área inter lamelar. Todas as medidas foram ampliadas 2000x.

A observação das preparações das brânquias e a identificação das possíveis lesões foi sempre realizada mantendo oculto o código de identificação das amostras.

O procedimento de observação das preparações microscópicas para visualização de alterações foi realizado em dois passos: pontuação das patologias presentes na brânquia identificadas *a priori* e realização de morfometrias presentes numa determinada área de observação sub-amostrada previamente definida (Figura 28). De seguida estão descritos em detalhe as duas etapas de observação microscópica das preparações.

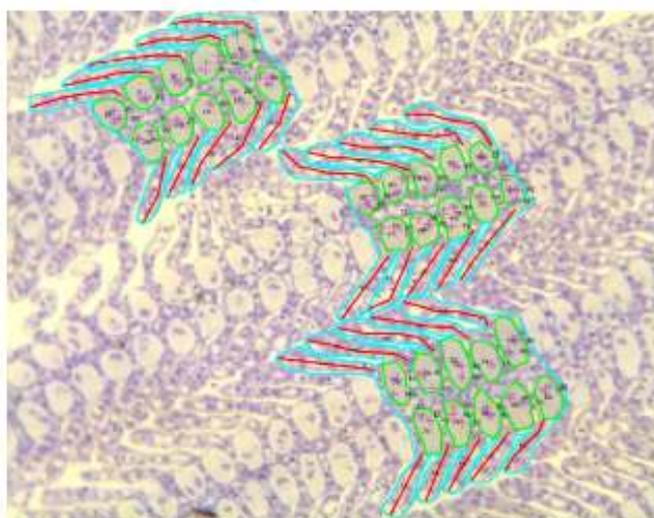


Fig. 28 – Medições histológicas das preparações microscópicas de *P. marinus*. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. A área amostrada está definida pela linha azul, o comprimento da lamela secundária pela linha vermelho, a área do *cluster* de CC pela linha verde e os núcleos por uma coloração rosa claro. Azul de Toluidine-PAS, ampliação: 200x.

Identificação e pontuação das patologias

A identificação e pontuação das patologias observadas nas brânquias de lampreia-marinha foram realizadas de acordo com o índice histopatológico proposto por Bernet *et al.* (1999). A utilização deste índice permite a descrição e avaliação de alterações patológicas em tecidos de peixe, principalmente espécies de água doce. Consiste num método padronizado, que permite que seja comparável com outros estudos. Este índice é baseado em dois fatores: a extensão da alteração patológica que é classificada com uma pontuação (*score value*) e a importância patológica desta alteração definida *a priori* com um fator de importância. A pontuação dada pelo observador a uma alteração patológica varia de 0 e 6, dependendo do grau da extensão de cada alteração: (0) sem qualquer modificação; (2) ocorrência mínima; (4) ocorrência moderada; (6) ocorrência severa ou difusa. Valores intermédios são igualmente considerados (Bernet *et al.*, 1999). A relevância de uma lesão depende da sua importância patológica, isto é, como afeta a função e a aptidão do animal em sobreviver. Isto é tido em conta através do fator de importância definido em cada alteração incluída no índice (Quadro 4). Desta forma, as alterações são classificadas em três fatores de importância: (1) importância patológica mínima, a lesão é facilmente reversível assim que a exposição ao agente irritante cessar; (2) importância patológica moderada, a lesão é reversível na maioria dos casos se o agente de *stress* for neutralizado; e (3) importância patológica marcada, a lesão é em geral irreversível, levando à perda parcial ou total da função do órgão (Bernet *et al.*, 1999). No Quadro 4, encontram-se descritas as patologias avaliadas e o respetivo fator de importância. O somatório das pontuações ponderadas pelos fatores de importância das alterações diagnosticadas é convertido em índices sobre os quais as análises estatísticas devem ser realizadas (Bernet *et al.*, 1999).

Apesar deste índice poder ser aplicável a vários órgãos e tecidos (fígado, branquia e pele), neste trabalho apenas foi utilizado no epitélio branquial, sendo o seu valor máximo, isto é, 138 que correspondente a uma pontuação de 6 em todas as alterações patológicas.

Quadro 4 – Padrões de reação patológicos e fatores de importância propostos por Bernet (Bernet *et al.*, 1999).

Padrão de Reação	Tipo de alteração (Pontuação 0-6)	Factor de importância (Pontuação 0-3)
Distúrbios circulatórios	Hemorragia/Hiperémia/Aneurisma e dilatação dos vasos sanguíneos	1
	Edema	1
Alterações regressivas	Alterações arquiteturais e estruturais (vacuolação, descolamento epitelial)	1
	Alterações plasmáticas (lipofuscina, melanocitos)	1
	Depósitos	1
	Alterações nucleares (picnose, cariorrexe, cariólise e nucleos pleomórficos)	2
	Atrofia	2
Alterações progressivas	Necrose (oncótica e apoptótica)	3
	Hipertrofia	1
Inflamação	Hiperplasia (fusão)	2
	Activação do Sistema reticuloendotelial (exudado – catarral: muco, supurativo: leucocitos)	1
Tumor	Infiltração (leucocitária)	2
	Benigno	2
	Maligno	3

Morfometrias

Os critérios utilizados na medição de estruturas das brânquias de *P. marinus* consistiram num compromisso entre a utilização do maior número de preparações microscópicas possível (o número de lamelas primárias posicionadas no plano correto foi variável entre preparações) e a representatividade das medições em cada preparação microscópica (e indivíduo). Desta forma, foi estabelecido que seriam medidos três filamentos mas observada toda a amostra para a identificação das patologias.

Análise estatística dos dados

O pacote estatístico do programa IBM SPSS Statistics versão 20.0 foi utilizado para o tratamento dos dados e análise estatística. Os dados foram transformados sempre que necessário de forma a garantir os pressupostos de normalidade, independência e homocedasticidade. Os resultados para os AGs identificados foram expressos em percentagem do total de AGs na amostra, com a finalidade de eliminar efeitos de concentração.

$$\text{Área \%} = (A_i / \Sigma A) \times 100$$

A_i = área do pico individual; ΣA = soma de todas as áreas dos picos identificados

Para os resultados do ensaio experimental foi utilizada a análise de variância (ANOVA I). O primeiro conjunto de variáveis (perfil de AGs de fosfolípidios de BLM) composto por 20 observações x 8 parâmetros (SFA, MUFA, PUFA, ω 3-FA, C18:1 ω 9, C24:1 ω 9, C20:5 ω 3 e C22:6 ω 3) e o delineamento estatístico incluiu um fator: concentração de ATZ (três concentrações fixas: ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀). Esta análise foi usada para testar a *H₀*: juvenis de lampreia-marinha expostos a diferentes concentrações de ATZ apresentam uma composição de AGs de fosfolípidios de BLM similares.

O segundo conjunto de dados (caracterização da BLM em termos de LT, CT, PT, CT/PT e atividade do enzima Na⁺/K⁺-ATPase), composto por 20 observações x 5 variáveis e o *design* estatístico incluiu um fator: concentração de ATZ (três concentrações fixas: ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀). Esta análise foi usada para testar a *H₀*: juvenis de lampreia-marinha expostos a diferentes concentrações de ATZ apresentam valores similares de LT, CT, PT, CT/PT e atividade do enzima Na⁺/K⁺-ATPase da BLM.

No presente estudo pretende-se distinguir as variáveis que permitiam diferenciar ou separar os grupos expostos a diferentes concentrações de ATZ. Desta forma, procedeu-se à análise discriminante multivariada (MDA) a fim de se conhecer qual ou quais os AGs que maior contribuição tiveram para a diferença entre os grupos analisados (CI, ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀) relativamente ao perfil dos fosfolípidios da BLM.

A MDA consiste numa técnica de estatística multivariada utilizada para atingir vários objetivos, tais como a identificação das variáveis que melhor diferenciam entre dois ou mais grupos de indivíduos estruturalmente diferentes e mutuamente exclusivos. Trata-se da técnica estatística mais apropriada para a separação de dois ou mais grupos definidos *a priori* (Hair *et al.*, 1998), sendo que pode vir a ser usada para determinar quais as variáveis que têm maior capacidade de predizer o grupo (Anónimo, 2003). Estas variáveis podem ainda ser utilizadas para criar um “índice” ou “função discriminante” que represente de forma moderada as diferenças entre os grupos. A partir das variáveis introduzidas obtém-se uma matriz de variância e covariância totais e uma matriz conjunta da variância e covariância intra grupos. A existência de diferenças significativas entre grupos, tendo em conta todas as variáveis, pode ser determinada pela comparação destas duas matrizes através de testes multivariados de F. A análise foi realizada segundo o método *stepwise* ascendente de combinação de variáveis que melhor separam os grupos, utilizando um valor de F de entrada (F=3.84) e um valor de F de remoção (F=2.71), respetivamente, para inserir ou remover uma variável. Deste modo, todas as variáveis são avaliadas, passo a passo, de forma a determinar qual a que mais contribui para a discriminação dos grupos, e assim maximizar a distância mínima de Mahalanobis (D₂) (Hair *et al.*, 1998). Essa variável é então incluída no modelo se a sua adição aumentar significativamente D₂, e o processo recomeça, caso contrário a variável é removida. O valor de F para a variável revela a sua contribuição no prognóstico de pertencer a um determinado grupo e, assim sendo, indica o seu significado estatístico na discriminação entre grupos. O teste lambda de Wilk (λ) explica as diferenças entre os grupos, para cada função individualmente. Este valor de lambda de Wilk (λ) é calculado através da divisão entre a variação não explicada e a variação total, e obtém valores que variam entre 0 e 1, sendo que os menores valores indicam grandes diferenças entre grupos e os valores elevados inexistência de diferenças.

Para testar a igualdade entre os centróides, que representam o valor médio dos resultados discriminantes de um grupo (Hair *et al.*, 1998), realizou-se uma transformação qui-quadrado do lambda de Wilk's (λ). Esta transformação permite ainda verificar se todas as variáveis canônicas (resultados das funções discriminantes individuais, que representam combinações lineares das variáveis originais (Hair *et al.*, 1998) refletem diferenças entre populações ou apenas variação aleatória.

De modo a avaliar o sucesso da classificação das amostras, obtida através da análise discriminante efetuada, analisa-se a distribuição dos indivíduos pelos grupos a partir do gráfico das variáveis canônicas (função ortogonal). Assim, indivíduos do mesmo grupo aparecem mais próximos que indivíduos de grupos diferentes. O método de validação cruzada do tipo *leaving-one-out* permite calcular a taxa de erro de classificação. Por fim, para analisar o significado estatístico e testar a exatidão da classificação recorre-se ao teste Q de *Press*, no qual H_0 : matriz de classificação idêntica ao que seria de esperar se as suas características fossem apenas devidas ao acaso (Hair *et al.*, 1998).

Capítulo 4: Resultados e Discussão

No presente estudo, a taxa de mortalidade ($< 10\%$) não foi significativa ($p > 0,05$) e não se detetou qualquer alteração expressiva na atividade dos animais durante o ensaio experimental, a não ser a secreção de muco principalmente nos indivíduos expostos a ATZ. De facto foi observada alguma secreção de muco em alguns indivíduos pertencentes a ambos grupos expostos a ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀ sendo esta secreção um importante mecanismo de defesa na redução da taxa de absorção de poluentes (Fernandes-Castilho *et al.*, 2007). A produção de muco é geralmente referenciada em estudos patomorfológicos após exposição aguda a alguns pesticidas triazínicos (Hostovsky *et al.*, 2014). Geralmente, a secreção de muco corporal e, em particularmente a secreção de muco branquial, são ocorrências frequentes em 55% dos estudos em que há exposição aguda a poluentes, em 27% de estudos com exposição crónica a doses letais e em 18% dos estudos com exposição doses subletais (Mallat, 1985; Paulino *et al.*, 2012; Mela *et al.*, 2013; Hostovsky *et al.*, 2014).

As células mucosas do epitélio branquial são responsáveis pela secreção de uma camada de glicoproteínas e glicolípidos, que funciona como um mecanismo de protecção do epitélio (Bresseghele *et al.*, 2004), atuando o muco como uma barreira ao estabelecer uma função de protecção (Torres e Christofolletti, 2008). Contudo, Takashima e Hibiya (1995) referem que a acumulação de muco na superfície branquial pode levar a uma diminuição na eficiência da troca gasosa (Takashima e Hibiya, 1995). De facto, situações de hiper secreção podem conduzir à hipóxia interna na medida em que promovem a existência de uma camada estática à superfície das lamelas, que aumenta a distância de difusão do oxigénio (Fernandes-Castilho *et al.*, 2007). A fim de responderem a este tipo de situação, os peixes aumentam a frequência respiratória, compensando assim a reduzida absorção de oxigénio (Fernandes-Castilho *et al.*, 2007).

Uma vez que durante todo o ensaio experimental os animais não foram alimentados, não se pode deduzir o efeito da concentração de ATZ na ingestão, usualmente referenciado em vários estudos como uma alteração de comportamento induzida por este e outros herbicidas (Irving *et al.*, 2003).

A ATZ é um contaminante orgânico e como quaisquer triazina, apresenta a capacidade de perturbar qualquer padrão comportamental, diminuir ações reflexas, reduzir atividades que envolvem o processo de mobilidade ou mesmo de ingestão (Hussein *et al.*, 1996). Os indicadores comportamentais têm sido considerados como marcadores chave relacionados com respostas aos agentes de *stress* (Hostovsky *et al.*, 2014). Por exemplo, o peixe-zebra, quando exposto a várias concentrações de ATZ, adopta um comportamento de preferência por habitats escuros (Steinberg *et al.*, 1995). Todavia, como durante o ensaio experimental, os juvenis de lampreia-marinha foram sempre mantidos no escuro para evitar o *stress* relacionado com comportamento de fototaxia negativa, modificações comportamentais como a anterior não puderam ser avaliadas.

Outros efeitos têm sido referenciados em peixes nos quais se incluem danos a nível do epitélio branquial e renal, alterações de excreção renal de iões (Na^+ , Cl^-) e de proteínas. A título de exemplo, na truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Fisher-Scherl *et al.*, 1991), na carpa (*Cyprinus carpio* L.) (Neskovic *et al.*, 1993) e em

machos de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) foi observada a redução de testosterona plasmática e da sensibilidade olfativa (Moore e Waring, 1998). Estudos com *smolts* (salmão jovem que migra pela primeira vez de água doce para salgada) de salmão do Atlântico revelaram ainda alterações comportamentais natatórias na presença de ATZ, tais como, inibição da migração para jusante em água doce e imediatamente após a transferência para água salgada (Waring e Moore, 2004). Similarmente, a atividade natatória dos animais diminuiu de forma significativa na presença de concentrações de ATZ da ordem de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Moore *et al.*, 2007).

Alguns parâmetros biométricos que caracterizam a população em estudo encontram-se apresentados no Quadro 5. A massa corporal (MC) média dos três primeiros grupos foi aproximadamente de 4,4 g e no grupo ATZ₁₀₀ de 4,1 g. Relativamente à massa branquial (MB) média nos três primeiros grupos foi aproximadamente de 0,05 g e no grupo ATZ₁₀₀ foi de 0,06 g. Por fim, o comprimento corporal (C) médio dos indivíduos oscilou entre 138 e 144 mm, apresentando os indivíduos do grupo ATZ₀ o maior comprimento por oposição aos indivíduos do grupo CI.

Quadro 5 – Parâmetros biométricos do grupo CI e dos grupos experimentais de juvenis de lampreia-marinha expostos a duas concentrações de ATZ.

Ensaio	Parâmetro	P1	P2	P3	P4	P5
CI	MC	5,00±0,95	3,83±0,41	5,05±1,03	4,15±0,65	4,16±0,38
	MB	0,067±0,02	0,059±0,02	0,054±0,02	0,065±0,02	0,045±0,02
	C	146,8±11,03	126,4±8,44	147,4±12,10	137,0±7,42	133,6±4,28
ATZ ₀	MC	4,80±1,10	4,80±1,10	4,00±0,00	4,20±0,45	4,40±0,89
	MB	0,056±0,02	0,062±0,02	0,059±0,02	0,061±0,01	0,056±0,01
	C	145,8±5,72	148,0±12,63	141,4±7,77	145,40±8,32	139,4±7,64
ATZ ₅₀	MC	4,49±0,81	4,89±0,89	4,27±0,75	4,24±0,90	4,48±0,69
	MB	0,055±0,02	0,060±0,04	0,039±0,02	0,052±0,02	0,055±0,01
	C	143,8±8,70	146,0±9,82	140,0±7,97	136,2±10,59	141,2±7,85
ATZ ₁₀₀	MC	4,31±0,70	3,92±0,52	4,09 ±0,74	4,15±0,65	4,40±0,45
	MB	0,065±0,02	0,059±0,01	0,073±0,02	0,065±0,02	0,079±0,01
	C	140,4±7,57	140,2±8,58	144,0±4,53	137,0±7,42	144,6±5,55

Legenda: P corresponde a *Pool*, MC média da massa corporal (g), MB média da massa branquial (g) e C a média do comprimento (mm).

As membranas biológicas são a primeira fronteira que separa o meio intracelular do meio extracelular sendo um alvo primordial quando ocorrem situações de *stress*. Alterações nas condições ambientais causam modificações quer na organização estrutural quer na dinâmica dos lípidos de membrana, podendo desta forma alterar atividade celular e o funcionamento das proteínas membranares. Recorde-se que modificações induzidas pela temperatura ao nível dos lípidos de membrana podem originar várias alterações a nível dos AGs presentes: classe, teor, combinação de espécies moleculares de uma dada classe de fosfolípidos, equilíbrio entre lípidos

desestabilizadores e estabilizadores da bicamada lipídica, relação entre o colesterol e os lípidos totais/polares, entre outras (Hazel, 1995). De facto, as membranas biológicas respondem a flutuações de certos parâmetros ambientais alterando os lípidos que as constituem, nomeadamente o grau de insaturação dos AGs constituintes dos fosfolípidos e o teor de colesterol, de modo a permitir manter a fluidez membranar e preservar o meio no qual se inserem as proteínas de membrana (Hazel, 1995).

As brânquias são o primeiro órgão a contactar e, conseqüentemente, a responder à exposição a poluentes aquáticos e variações físico-químicas da água, resultando em alterações nas células epiteliais e possível deterioração das suas funções (Mela *et al.*, 2013).

Histologicamente, foram observadas modificações na estrutura e organização das células de brânquias nos indivíduos expostos à ATZ. As CCs e PCs, foram facilmente identificadas nos filamentos de brânquias na medida em que formam uma fileira contínua na região intra-lamelar (Figura 30 a). Contudo, os resultados não apresentam variação significativa ($p < 0,05$) na área de superfície e densidade dos clusters de CCs embora tenha sido observada uma tendência de aumento dos valores de densidade no ensaio ATZ₀ (Figura 29)

Em situações de contacto com agentes tóxicos, tem sido relatada a proliferação de CCs nos filamentos ou na superfície lamelar (Bindon *et al.*, 1994). O estudo refere que os ajustamentos morfológicos e fisiológicos envolvem a variação do número e/ou tamanho das CCs (Bindon *et al.*, 1994). Outros trabalhos corroboram que há um aumento na área apical e na densidade dessas células como uma resposta adaptativa à presença de um poluente na água (Brunelli *et al.*, 2001; Cerqueira e Fernandes, 2002; Giari, 2008).

A comparação entre os grupos ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀ não revelou diferenças significativas ($p = 0,290$) em relação à área de superfície dos clusters de CCs embora fosse espectável que a exposição à ATZ pudesse levar a um aumento das mesmas (Mela *et al.*, 2013) (Figura 29). Tal facto poderá apontar para uma adaptação dos tecidos das brânquias à exposição ao herbicida e indiciar uma possível capacidade de regeneração destas células por parte dos juvenis de lampreia-marinha. Um estudo realizado em células branquiais em *Prochilodus lineatus* quando exposto $25 \mu\text{gL}^{-1}$ à ATZ, revelou um decréscimo inicial no número de CCs nos filamentos, o qual deixou de ser detetado ao fim de 14 dias de exposição (Paulino *et al.*, 2012).

Em relação ao grupo CI, também não se detetaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre este e os grupos expostos à ATZ, sujeitos a um incremento de salinidade até 35 no que se refere ao número de CCs e área dos *clusters*. Este resultado pode ser justificado pelo facto dos juvenis se caracterizarem já por um desenvolvimento completo das células branquiais e densidade elevada das CCs de forma a poderem entrar em meio oceânico. Desta forma, isto aponta para o facto de todos os juvenis estarem completamente adaptados a fazer face à água salgada, mesmo aqueles que permaneceram durante todo o ensaio em água doce (Grupo CI) (Beamish *et al.*, 1978; Reis-Santos *et al.*, 2008).

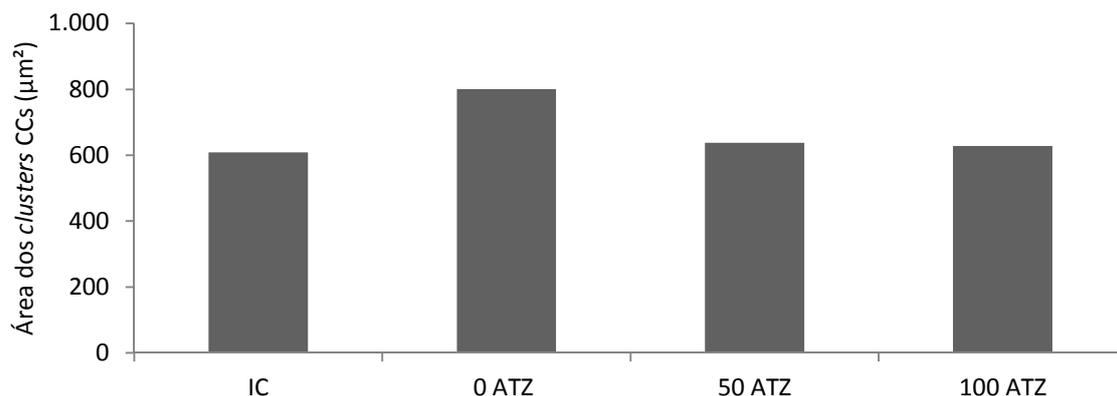


Fig. 29 – Área de superfície dos *clusters* de células clorídricas da BLM do tecido branquial de juvenis a diferentes concentrações de ATZ.

De acordo com Mallat (1985), inúmeros poluentes, incluindo ATZ, induzem alterações nas brânquias sendo as mais frequentes o descolamento epitelial, a inflamação, hipertrofia, hiperplasia, fusão lamelar, achatamento das lamelas secundárias e formação de aneurismas (Flores-Lopes e Thomaz, 2011).

Na Figura 30 apresentam-se os cortes de brânquias de alguns indivíduos e nas quais se observaram alguns exemplos das alterações histológicas referidas.

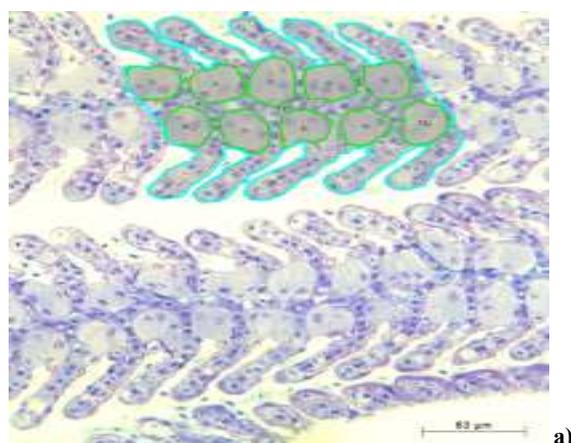


Fig. 30 – Apresentação histológica observada em brânquias de *P. marinus*, na ausência de ATZ. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Pode-se notar a presença de *clusters* de células clorídricas e filamentos lamelares secundários de brânquias sem alterações histológicas.

Histologicamente, o epitélio branquial dos indivíduos do CI e do grupo ATZ₀ apresentaram um padrão estrutural típico ao nível dos filamentos e lamelas de brânquias com CCs e PVs muito bem definidas (Figuras 30, 31 e 32). No entanto, as alterações histológicas mais marcantes nos indivíduos expostos a 50 µgL⁻¹ de ATZ foram hiperplasia moderada distal das lamelas, ligeira fusão lamelar e descolamento do epitélio lamelar (Figura 33). Já as preparações correspondentes aos indivíduos expostos a 100 µgL⁻¹ de ATZ revelaram como lesões mais

evidentes o espessamento dos filamentos numa estrutura lamelar irregular, hiperplasia ligeira distal das lamelas e, ruptura ligeira das células pilar (Figura 34).

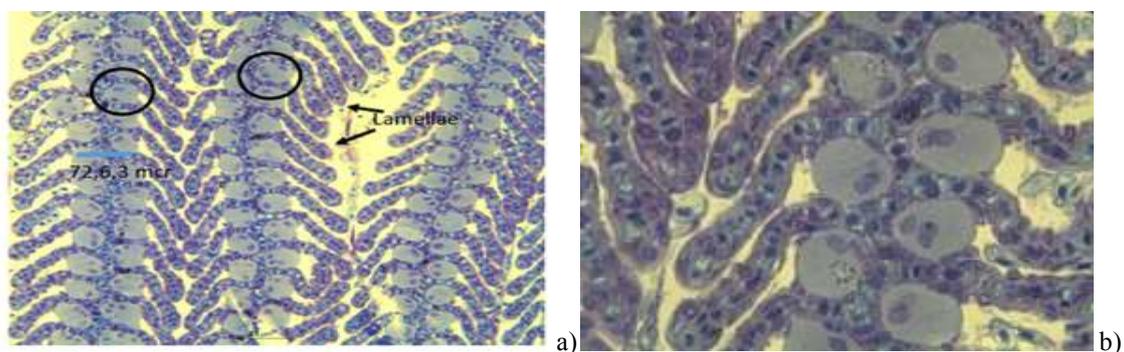


Fig. 31 – Preparações histológicas do ensaio CI. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Observa-se, à esquerda, filamentos de lamelas (seta) e *clusters* de células clorídricas (circulo preto) e à direita, a cariólise de um núcleo de uma célula clorídrica pertencente a um *cluster*.

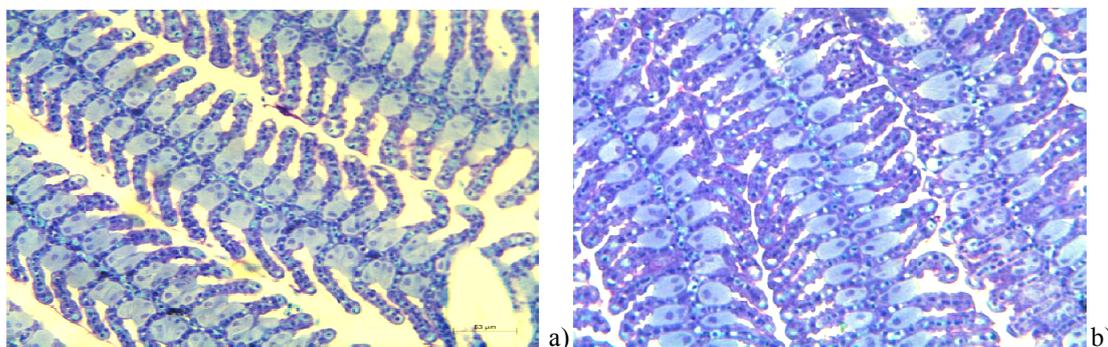


Fig. 32 – Preparações do ensaio ATZ₀. Não se evidenciam de alterações histológicas. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x.

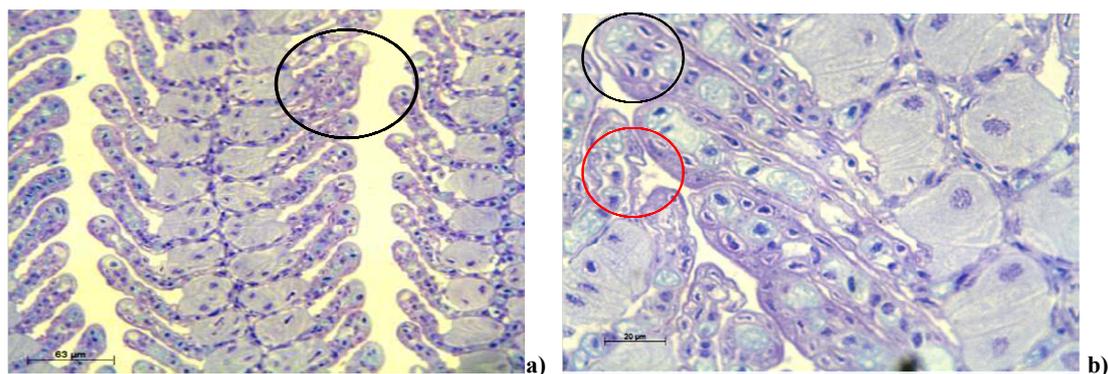


Fig. 33 – Preparações histológicas do ensaio ATZ₅₀. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Observa-se a fusão de duas lamelas (circulos pretos) e descolamento epitelial ligeiro da lamela (circulo vermelho).

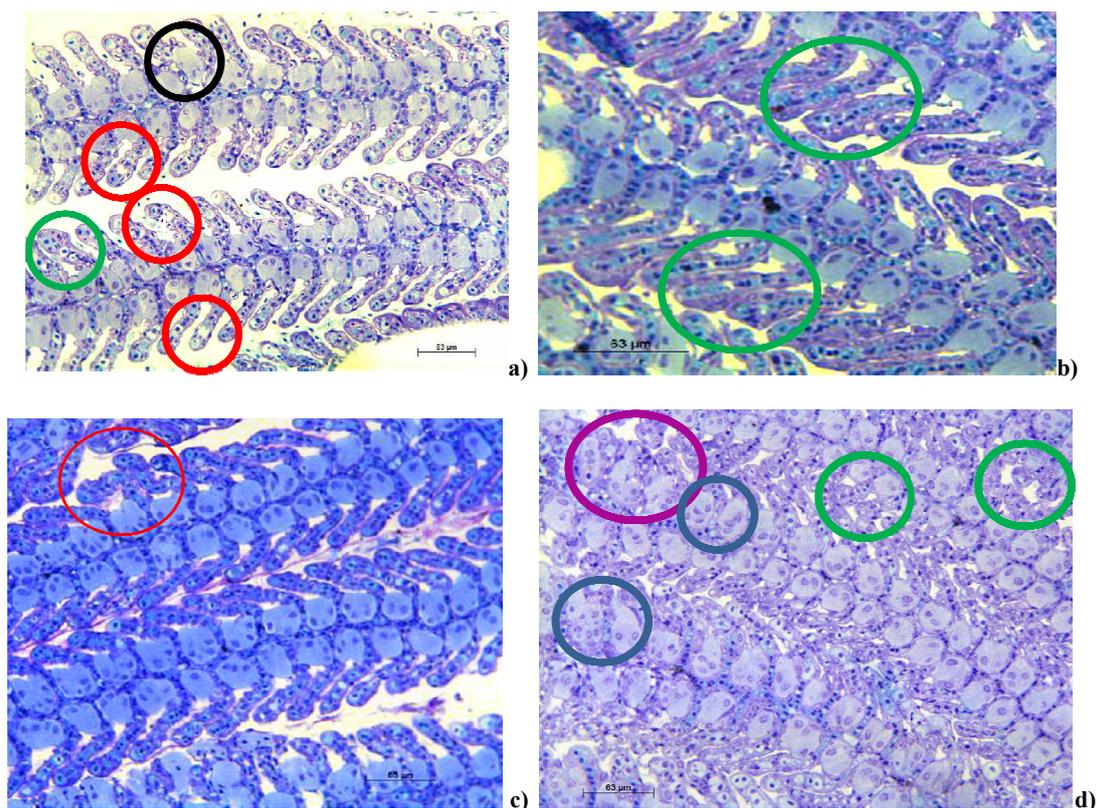


Fig. 34 – Preparações histológicas do ensaio ATZ₁₀₀. Corante Azul de Toluidine-PAS e amplificação 2000x. Observa-se hipertrofia lamelar e proliferação de células epiteliais (círculos verdes), alterações e ruptura de células pilar (círculos vermelhos), alterações na estrutura de células epiteliais (círculo preto), fusão lamelar extensa e proliferação de células epiteliais que dificultam a captação de oxigênio das células sanguíneas (círculo roxo) e aumento do número de CCs dentro de um *cluster* de CCs (círculo laranja).

Tal como nos ensaios de Hughes and Perry (1976) e Tietge et al. (1998), foi observada hiperplasia epitelial lamelar ligeira a moderada nas brânquias dos juvenis expostos a ambas as concentrações de ATZ. Na medida em que a hiperplasia se caracteriza pelo aumento da proliferação das células, esta pode conduzir à fusão das lamelas e, mais raramente, dos filamentos (Heath, 1987; Hinton *et al.*, 1992), o que parece ter acontecido quer nos juvenis expostos à ATZ₅₀ quer nos juvenis expostos à ATZ₁₀₀ em virtude da fusão lamelar e do espessamento dos filamentos de brânquias observados. A fusão e a espessura das camadas epiteliais de lamelas secundárias adjacentes resultaram do aumento no número de divisões mitóticas do epitélio lamelar (Karlsson-Norrgren *et al.*, 1985) com a finalidade de retardar e/ou impedir a entrada de substâncias tóxicas na corrente sanguínea (Kantham e Richards, 1995; Ayoola, 2008b).

Nos juvenis expostos à menor concentração de ATZ, foi igualmente detetado descolamento epitelial, o qual se caracteriza pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar para longe do sistema de células pilar, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue. Ocorre a formação de um espaço que pode ser preenchido por fezes, levando à formação de um edema intersticial (Wendelaar Bonga e Lock, 1992; Thophon *et*

al., 2003). Esta alteração pode ser assim interpretada como sendo uma reação inicial das brânquias ao agente de *stress* ATZ e, portanto, ter sido manifestada apenas perante a menor concentração de exposição.

Quando submetidos à maior concentração de ATZ, verificou-se que algumas lamelas de brânquias também apresentaram alterações vasculares tais como a vasodilatação marcada do eixo vascular, congestão vascular e edema justa lamelar pronunciado conduzindo à ruptura das células pilar, com conseqüente perda da sua capacidade de suporte. Conseqüentemente, foram verificados alguns exemplos de aneurismas lamelares, os quais prejudicam a integridade vascular com a libertação de grande quantidade de sangue (Heath, 1987; Hinton *et al.*, 1992; Garcia-Santos *et al.*, 2006).

Em seguida, as alterações histológicas observadas foram agrupadas de acordo com índice de Bernet *et al.*, (1999), em várias categorias de distúrbios: circulatórios, regressivos, progressivas e inflamatórios tal como ilustrado no Quadro 16 e determinou-se a pontuação.

Quadro 6 – Pontuação das alterações histológicas.

Alterações histológicas	Pontuação			
	CI	ATZ0	ATZ50	ATZ100
Hemorragia	1,0	1,3	1,0	1,3
Hiperémia	1,4	1,4	1,4	1,3
Aneurisma	1,6	1,0	1,0	1,0
Dilatação	1,6	1,5	1,0	1,0
Edema	1,1	1,0	1,4	1,0
Fusão	1,9	2,5	2,0	1,8
Vacuolação	1,1	1,0	2,0	1,8
<i>Lifting</i>	1,9	1,3	1,2	1,8
Lipofuscina	1,3	2,3	1,0	2,5
Melanócitos	4,6	3,0	2,6	3,0
Pleomorfismo	5,1	2,1	5,6	4,3
Necrose	6,1	5,8	4,8	4,1
Hipertrofia	4,7	4,5	5,4	6,9
Hiperplasia	2,0	1,5	5,0	6,4
Infiltração	1,4	1,6	1,6	1,6
Muco	4,9	5,6	4,6	5,8
Leucocitos	2,6	1,9	1,2	1,5

De acordo com o índice de Bernet *et al.*, (1990) constatou-se que as alterações histológicas com maior grau de severidade foram a hiperplasia, hipertrofia, a infiltração, a fusão lamelar e a presença de muco. Todavia nenhuma delas conduziu à perda da integridade estrutural lamelar que pusesse em causa as funções respiratória e de osmorregulação dos juvenis, o que é apoiado pela ausência de mortalidade durante todo o ensaio experimental.

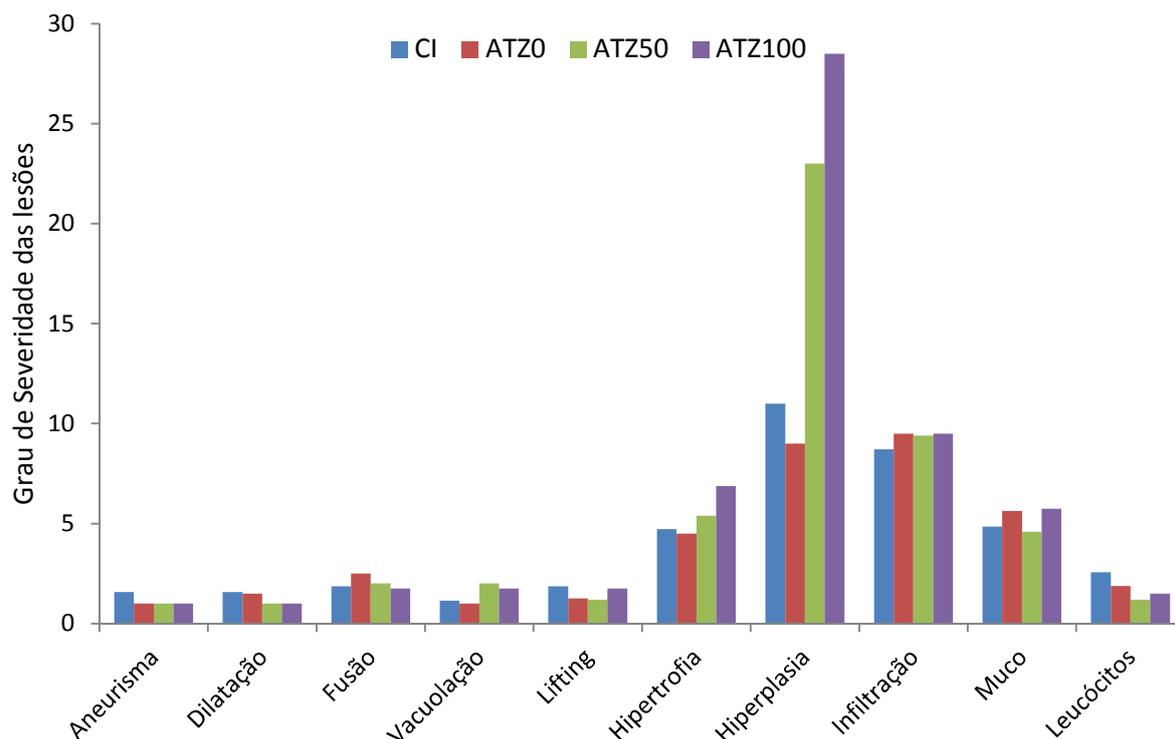


Fig. 35 – Distribuição das alterações histológicas mais evidentes nos grupos em estudo segundo o grau de severidade, proposto por Bernet *et al.* (1990).

No Quadro 7, são apresentados os resultados referentes aos biomarcadores testados na BLM: lípidos totais (LT), proteínas totais (PT), teor de colesterol total (CT) e atividade catalítica da Na^+/K^+ -ATPase. O valor de CT foi normalizado para as proteínas presentes sendo dado como quociente. Pode verificar-se a tendência de diminuição dos LTs nos grupos ATZ_{50} e ATZ_{100} e o oposto em relação ao CT. Verificou-se que para a PT o menor valor observado foi no grupo ATZ_{50} .

Quadro 7 – Parâmetros bioquímicos da BLM do tecido branquial de juvenis do CI e expostos a diferentes concentrações de ATZ.

Ensaio	LT (mg)	PT (μg)	CT (μg)	CT/PT (%)	CT/LT (%)	Act. Na^+/K^+ -ATPase	Act.esp. Na^+/K^+ -ATPase
CI	20,70 \pm 0,01	1027,5 \pm 0,24	73,2 \pm 0,03	7,1	0,35	3,67 \pm 3,42	0,15 \pm 0,002
ATZ_0	26,85 \pm 0,01	1705,5 \pm 0,33	186,0 \pm 0,11	11	0,69	13,07 \pm 6,71	0,27 \pm 0,002
ATZ_{50}	23,70 \pm 0,01	690,0 \pm 0,18	228,0 \pm 0,09	33	0,96	3,32 \pm 3,76	1,056 \pm 0,04
ATZ_{100}	18,15 \pm 0,01	1065,0 \pm 0,17	172,5 \pm 0,11	16	0,95	6,46 \pm 0,94	0,216 \pm 0,003

Legenda: Act. corresponde à atividade catalítica (mmole Pi/min) e Act.esp. à atividade específica (mmole Pi/min/mg PT) da Na^+/K^+ -ATPase.

Os resultados da ANOVA I evidenciam que a BLM das CCs não reflete diferenças significativas respeitantes aos valores de LT ($p=0,516$), CT ($p=0,841$), razão CT/PT ($p=0,067$) e atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase ($p=0,484$). Em relação ao conteúdo proteico, os indivíduos do grupo CI revelaram valores significativamente ($p=0,043$) mais baixos que os indivíduos do ATZ_0 . Os indivíduos expostos a $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de herbicida revelaram o valor significativamente mais baixo ($p\leq 0,002$) de todos. Como consequência, a razão CT/PT também evidenciou uma tendência de valores mais elevados no grupo ATZ_{50} , embora não significativa estatisticamente.

Da leitura do quadro, que apresenta os AGs que constituem o perfil de fosfolípidos da BLM para os diferentes grupos, verifica-se que os SFAs mais representativos foram o C16:0 e o C18:0 com percentagens de 15.96-22.41% e 8,32-11,17%, respetivamente. O MUFA mais expressivo foi C18:1 ω 9 (10.83-16.37%), sendo um dos mais variáveis a par de C22:1 ω 9 e do C24:1 ω 9. Em termos de PUFAs, o mais representativo foi o C20:3 ω 3 (9.16 to 15.27%), presente em todos os grupos menos no ATZ_{100} seguido pelo C20:5 ω 3 (3.96-7.79%). O ácido araquidónico (AA, C20:4 ω 6) não foi detetado em nenhum dos quatro grupos e o ácido docohexaenoico (DHA, C22:6 ω 3) não foi obtido em nenhum dos dois grupos expostos à ATZ. No entanto, no grupo CI e ATZ_0 , foi encontrado numa percentagem de aproximadamente 2%. O conteúdo do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω 3) diminuiu na presença de ATZ.

Os resultados revelaram diferenças significativas ($p=0,001$) em alguns parâmetros nos grupos sujeitos a diferentes concentrações de ATZ. Os parâmetros que contribuíram para as diferenças e o grau de contribuição para as mesmas foram: ω 3-HUFA ($p=0,001$; 84,8%), índice de insaturação ($p=0,001$; 69,1%); MUFA ($p=0,003$; 57,7%), PUFA ($p=0,003$; 56,4%), SFA ($p=0,010$; 49,7%) e finalmente C24:1 ω 9 ($p=0,032$; 41,4%).

Desta forma, os grupos expostos à ATZ revelaram níveis significativamente mais elevados de SFA que o grupo ATZ_0 ($p=0,014$ e $p=0,018$, respetivamente) e os indivíduos expostos a $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ATZ revelaram níveis significativamente mais elevados de MUFA que os indivíduos não expostos (CI: $p=0,030$ e ATZ_0 : $p=0,017$) (Figura 36). Os indivíduos expostos a concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de ATZ apresentaram ainda os valores mais baixos de PUFA (CI: $p=0,006$; ATZ_0 : $p=0,009$ e ATZ_{50} : $p=0,018$) e o conteúdo mais baixo de ω 3-HUFA (CI: $p=0,001$; ATZ_0 : $p=0,001$ e ATZ_{50} : $p=0,001$) (Figura 36).

Quadro 8 – Composição dos AGs dos fosfolípidos da BLM do tecido branquial de juvenis do CI e expostos a diferentes concentrações de ATZ.

AGs	CI	ATZ ₀	ATZ ₅₀	ATZ ₁₀₀	AGs	CI	ATZ ₀	ATZ ₅₀	ATZ ₁₀₀
SFA					MUFA				
C6:0	1.66±0.66	5.59±2.16	1.30±0.57	1.80±1.65	C14:1	0.79±1.15	ND	0.43±0.46	0.44±0.48
C8:0	3.07±3.0	4.67±1.30	0.68 ±0.23	1.05±0.53	C17:1	0.90±1.32	2.72±2.56	0.91±1.28	0.94±0.59
C10:0	4.06±2.10	7.44±2,33	3.62±2.62	0.84±1.29	C18:1ω9	13.68 ±2.86	16.37±1.96	10.83±1.80	15.40±6.72
C12:0	0.76±0.66	0.16±0.36	0.93±0.26	0.99±0.12	C20:1ω9	ND	ND	0.45±0.43	0.21±0.73
C14:0	4.74±2.19	3.76±0.92	3.40±0.78	4.34±1.12	C22:1ω9	0.14±0.35	ND	5.71±0.68	5.90±3.71
C15:0	4.25±1.33	3.40±0.55	2.80±0.94	3.47±1.13					
C16:0	22.41±3.73	15.96±2.28	16.12±2.66	20.09±1.52	PUFA				
C17:0	2.62±0.82	2.31±0.51	3.35±0.81	2.68±1.14	C18:2ω6	1.86±0.21	1.12±1.07	4.18±2.87	3.16±1.87
C18:0	10.61±2.38	10.07±2.47	8.32±0.26	11.17±2.47	C20:2	ND	ND	0.83±2.07	1.49±2.10
C20:0	0.26±0.37	ND	0.88±0.68	0.59±0.65	C20:3ω6	3.40±2.33	0.45±0.01	0.72±0.10	0.24±0.14
C22:0	3.30±1.34	1.50±1.0	4.30±1.47	6.14±4.28	C20:3ω3	11.55±5.05	15.27±3.35	9.16±4.94	ND
C23:0	1.66±0.35	ND	7.39±3.64	8.35±5.59	C20:4ω6	ND	ND	0.86±2.14	ND
C24:0	0.45±1.11	ND	2.79	1.42±1.08	C20:5ω3 (EPA)	5.17±2.10	7.79±1.86	4.97±1.08	3.96±2.50
					C22:2	ND	ND	0.71±1.78	2.88±5.0
					C22:6ω3 (DHA)	2.66±1.69	2.55±1.52	ND	ND

Os valores estão expressos em percentagem (%) do total de AGs (média ± DP, n = 25 indivíduos, # 5 pools).

Legenda: SFA – AGs saturados; MUFA – AGs monoinsaturados; PUFA – AGs polinsaturados e ND – Não detetável.

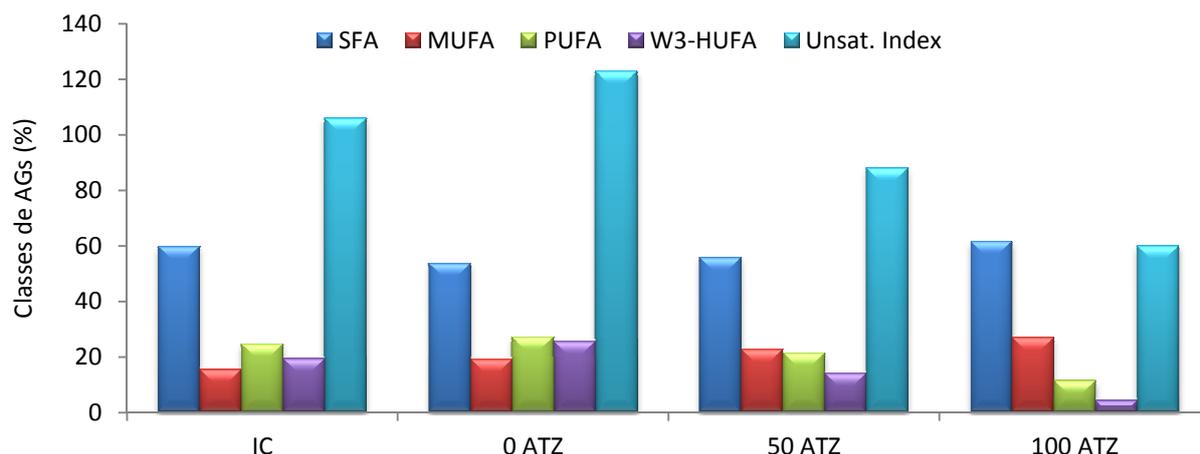


Fig. 36 – Distribuição das classes dos AGs de fosfolípidos de BLM do tecido branquial de juvenis de lampreia-marinha aclimatados a diferentes concentrações de ATZ: SFA (azul escuro), MUFA (vermelho), PUFA (verde), ω 3-HUFA (roxo) e o índice de insaturados (azul claro).

As diferenças entre os perfis de AGs observadas contribuiram assim para as diferenças significativas registadas para o índice de insaturação (Figura 36). Da análise dos resultados do índice de insaturação constata-se que este é maior na ausência de ATZ e apresenta o valor significativamente menor na presença da concentração mais elevada de herbicida.

A análise discriminante multivariada, baseada no perfil em ácidos gordos dos fosfolípidos da BLM provou ser estatisticamente significativa e correspondeu a 100% da variação total (Quadro 9, Figura 35).

Quadro 9 – Classificação da análise discriminante nos ensaios CI, ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀.

Grupos	Nºpools	% Correcta	Número de indivíduos correctamente classificados		
			2: ATZ ₀	3: ATZ ₅₀	4: ATZ ₁₀₀
2: ATZ ₀	5	100	5	0	0
3: ATZ ₅₀	5	100	0	5	0
4: ATZ ₁₀₀	5	100	0	0	5
Total	20	100			

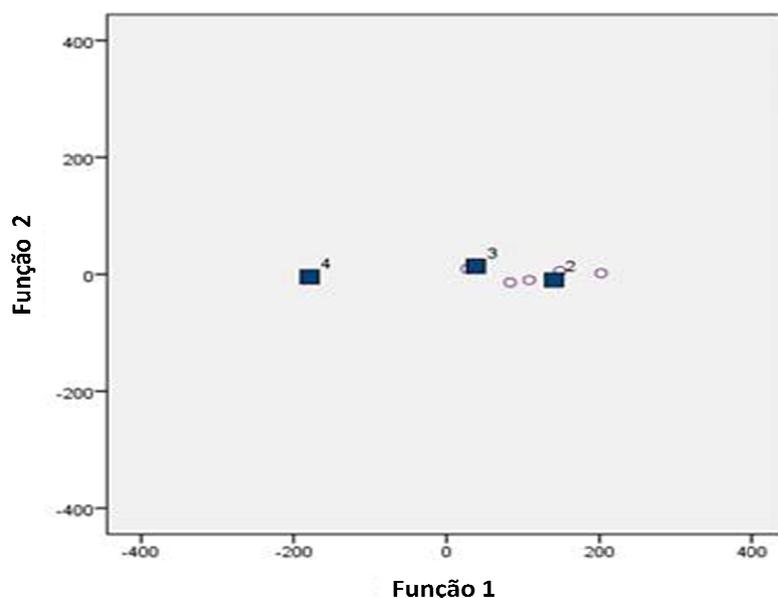


Fig. 37 – Análise da função discriminante canônica dos grupos ATZ₀, ATZ₅₀ e ATZ₁₀₀ que correspondem às respectivas cores: azul, verde, amarelo. Os círculos roxos correspondem a casos não agrupados, quadrado azul preenchido a centróides. 95,0% dos grupos originais estão correctamente classificados.

A separação de todos os centróides é estatisticamente significativa (Quadro 10):

Quadro 10 – Resultado do Teste Wilks' Lambda (Λ) para verificação da hipótese de que as médias dos centróides das funções são iguais nos três grupos experimentais

Função teste	Λ	χ^2	df	Sig.
1 através de 2	0,000	104,190	22	0,000
2	0,008	34,144	10	0,000

A MDA permitiu saber qual ou quais os AGs que mais contribuíram para as diferenças entre os perfis de fosfolípidos da BLM nos ensaios experimentais. Em virtude de todos os grupos estarem corretamente classificados, os resultados refletem assim uma assinatura típica de perfil de AGs das BLM para cada grupo. Os AGs que contribuíram para a segregação dos grupos foram quatro SFAs (C10:0 – 26,9%; C12:0 – 75,0%; C14:0 – 23,7% e C24:0 – 50,0%), três MUFAs da família ω 9 (C18:1 ω 9 – 25,6%; C20:1 ω 9 – 17,6% e C22:1 ω 9 – 78,8%) e quatro PUFAs (C18:2 ω 6 – 71,4%; C20:3 ω 6 – 6,0%; C20:3 ω 3 – 92,0% e C20:5 ω 3 – 31,7%), sendo o perfil da BLM sujeito a ATZ caracterizado pelos AGs menos insaturados acompanhados dos MUFA.

Em relação à atividade do Na⁺/K⁺-ATPase e para o grupo exposto à concentração mais elevada de ATZ, os resultados obtidos mostraram a existência de uma correlação altamente significativa (p=0,008) com SFA (ρ =0,966) e ainda a presença de uma correlação negativa significativa (p=0,040) com o C18:1 ω 9 (ρ =-0,895).

Em presença do nível mais elevado de ATZ, os resultados evidenciaram a existência de modulação na constituição da cadeia acil dos fosfolípidos da BLM, resultante do aumento do grau de saturação dos AGs da membrana. Tal facto, está de acordo com vários estudos que referem que o mecanismo mais importante para

regulação da fluidez membranar contra substâncias ativas da membrana, especialmente solventes orgânicos, consiste numa alteração da composição dos AGs da membrana celular e, em particular o aumento do grau de saturação dos mesmos (Laura *et al.*, 1996). Verificou-se ainda em relação aos ω 3-HUFA que na presença de ATZ, a BLM diminuiu significativamente as concentrações destes ácidos gordos, sendo inclusivamente a diminuição mais acentuada e significativa no grupo ATZ₁₀₀ quando comparada com o grupo ATZ₅₀.

Mais ainda, foi igualmente observado um aumento de MUFA nomeadamente no grupo ATZ₁₀₀, que parece evidenciar um mecanismo de compensação para uma possível redução na fluidez de membrana causada pelo aumento de SFA e redução de ω 3-HUFA detetado na presença da concentração de ATZ mais elevada. Vários estudos reportam que a acumulação de MUFA tende a aumentar a fluidez membranar em várias espécies (Roy *et al.*, 1993; Staurens *et al.*, 1994). Alguns estudos justificam a razão pela qual os MUFA - embora tenham capacidade para reduzir de forma marcada a ordem da membrana - não são tão eficientes como os PUFA no modo como se agregam na formação da bicamada lipídica, não conseguindo formar uma camada completamente selada que possa condicionar a permeabilidade de iões, geralmente dos catiões (Hazel, 1995). Em contrapartida, a presença das duplas ligações dos AGs altamente insaturados permite aumentar quer a ordem de membrana quer a extensão do movimento das cadeias acilo, mantendo desta forma o estado dinâmico apropriado da bicamada lipídica e a permeabilidade característica e compatível com a função biológica (Hazel, 1995).

De facto, em relação às alterações de propriedades físicas da membrana, os AGs monoénicos, tal como a família ω 9, são superiores ao PUFA relativamente, à magnitude das mudanças que produzem e ao baixo custo metabólico da sua produção (Hazel, 1995), situação que poderá ser benéfica durante processos de migração, que acarretam custos energéticos elevados tal como a migração trófica dos juvenis.

Relativamente à atividade da Na^+/K^+ -ATPase, os resultados não revelaram diferenças significativas entre grupos apesar do alto valor alcançado na presença da concentração mais baixa de ATZ. No entanto a correlação significativa observada entre a atividade Na^+/K^+ -ATPase e os SFA no grupo ATZ₁₀₀ evidencia que a modulação fosfolipídica da BLM é importante para a atividade deste transportador. Este estudo propõe que a modulação lipídica observada possa ser um mecanismo compensatório que se desenvolve de forma a assegurar a resposta normal do transportador Na^+/K^+ -ATPase quando em presença dos níveis elevados de concentração de ATZ.

Na medida em que a BLM contribui para a permeabilidade global/geral das células de brânquias e intervém na regulação do fluido intercelular, os resultados apontam para que o maior teor de SFA observado na exposição ao nível mais elevado de ATZ seja uma forma de reduzir a permeabilidade da BLM. Este facto correlacionado com a atividade Na^+/K^+ -ATPase pode ser uma forma de resistência da BLM ao *stress* hídrico e iónico que pode ocorrer após a exposição ao xenobiótico.

Capítulo 5: Conclusão

As alterações histológicas observadas não são específicas da ação da ATZ sobre as brânquias. De acordo com os resultados obtidos, as modificações encontradas nas brânquias de lampreia-marinha, para as concentrações testadas, podem ser classificadas como moderadas e, deste modo, não interferiram de forma nociva nas funções das brânquias, sugerindo as respostas celulares um ajuste bioquímico e morfológico para a manutenção da homeostase, o que se traduziu na ausência de mortalidade.

Os resultados referentes aos lípidos, evidenciam claramente a modulação lipídica dos AGs dos fosfolípidos da BLM mediante um processo de saturação, verificando-se igualmente uma forte correlação entre os SFA e os baixos níveis de atividade específica da Na^+/K^+ -ATPase. Desta forma, quer o perfil lipídico saturado quer a correlação significativa encontrada entre estes e a Na^+/K^+ -ATPase evidenciam um mecanismo compensatório que se desenvolve de forma a assegurar a osmorregulação dos juvenis em presença do nível mais elevado de ATZ.

Tendo em conta que a BLM contribui para a permeabilidade global/geral das células de brânquias e regula o fluido intercelular, provavelmente o maior teor de SFA verificado, reduz a permeabilidade da BLM e em correlação com a atividade Na^+/K^+ -ATPase compense as trocas hídricas e iónicas perante a exposição a níveis elevados de ATZ.

Propõem-se assim que estas respostas da BLM sejam uma estratégia adotada pelos juvenis de lampreia-marinha para compensarem a situação de *stress* causada pelos níveis de ATZ aos quais foram expostos e garantirem o sucesso da migração e a sobrevivência no oceano.

Capítulo 6: Referências Bibliográficas

- Abel, P. D. (1976). "Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.)." Journal of Fish Biology, **9**: 441-446.
- Ackman, R. G. (2002). "The chromatograph in practical analysis of common and uncommon fatty acids for the 21st century." Analytica Chimica Acta, **465**: 175-192.
- Adams, S. M.; Shugart, L. R.; Southworth, G. R. e Hinton, D. E. (1990). Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. Biomarkers of Environmental Contamination. McCarthy e Shugart. Boca Raton, Lewis Publishers: 333-353.
- ADP. (2007). "Qualidade da Água Bruta no Rio Douro." Águas no Norte Retrieved 19 de Maio 2015, 2015, from www.addp.pt.
- Agrahari, S. e Gopal, K. (2008). "Inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos." Pesticide Biochemistry and Physiology, **92**: 57-60.
- Almeida, J. S.; Meletti, P. C. e Martinez, C. B. R. (2005). "Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*." Comparative Biochemistry and Physiology, **140C**: 356-363.
- Almeida, P. R.; Quintella, B. R.; Dias, N. M. e Andrade, N. O. (2002). The anadromous sea lamprey in Portugal: Biology and Conservation perspectives. Vancouver, American Fisheries Society.
- Almeida, P. R.; Silva, H. T. e Quintella, B. R. (2000). The migratory behaviour of the sea lamprey *Petromyzon marinus* L., observed by acoustic telemetry in River Mondego (Portugal). Lowestoft, Suffolk, CEFAS.
- Almeida, P. R.; Silva, H. T. e Quintella, B. R. (2002). The spawning migration of the sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.), in the River Mondego (Portugal). Aquatic ecology of the Mondego river basin. Global importance of local experience. M. A. Pardal; J. C. Marques e M. A. Graça. Coimbra, Imprensa da Universidade de Coimbra: 381-386.
- Appelberg, R. (2005). "Esboços de bacias hidrográficas Portuguesas."
- Applegate, V. C. (1950). "Natural history of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*, in Michigan." Special Scientific Report 55: 237.
- Arellano, J. M.; Blasco, J. e Ortiz, J. B. E. E. R., v.3, p., 2000. (2000). "Accumulation and histopathological effects of copper in gills and liver of Senegales Sole, *Solea senegalensis* and toad fish, *Halobatrachus didactylus*. ." Ecotoxicology and Environment Restoration, **3**: 22-28.
- Arts, M. T. e Kohler, C. C. (2008). Health and condition in fish: the influence of lipids on membrane competency. Lipids in Aquatic Ecosystems. M. T. A. e al. Canada, Springer Science + Business Media: 237-256.
- Ayoola, S. O. (2008b). "Toxicity of glyphosate herbicides on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. ." African Journal of Agricultural Research, **3**(12): 825-834.
- Bartels, H.; Moldenhauer, A. e Potter, I. C. (1996). "Changes in the apical surface of chloride cells following acclimation of lampreys to seawater." American Journal of Physiology, **270**: 125-133.
- Bartels, H.; Pirlich, K. e Mallat, J. (1998). "Categorization of the mitochondria-rich cells in the gill epithelium of the freshwater phases in the life cycle of lampreys." Cell and Tissue Research, **291**: 337-349.
- Bartels, H. e Potter, I. C. (2004). "Cellular composition and ultrastructure of the gill epithelium of larval and adult lampreys. Implications for osmoregulation in fresh and seawater." Journal of Experimental Biology, **207**: 3447-3462.
- Batista, S.; Silva, E.; Cerejeira, M. J. e Silva-Fernandes, A. M. (2000). "Exposure of Ground Water to Alachlor, Atrazine and Metolachlor in Maize Areas of Ribatejo and Oeste (Portugal)." Toxicological & Environmental Chemistry, **79**(3-4): 223-232.

- Beamish, F. W. H. (1980). "Biology of the North American anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus*." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **37**: 1924-1943.
- Beamish, F. W. H.; Strachan, P. D. e Thomas, E. (1978). "Osmotic and ionic performance of the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus*." Comparative Biochemistry and Physiology, **60A**: 435-443.
- Begum, G. (2001). "Organ-specific ATPase and phosphorylase enzyme activities in food fish exposed to a carbamate insecticide and recovery response." Fish Physiology and Biochemistry, **37**(1): 61-69.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. e Stryer, L. (2002). Fatty Acid Metabolism. Nova York, Freeman.
- Bernet, D.; Schimdt, H.; Meier, W.; Burkhardt-Holm, P. e Wahli, T. (1999). "Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution." Journal of Fish Diseases, **22**: 25-34.
- Bindon, S. D.; Gilmor, K. M.; Fenwick, J. C. e Perry, S. F. (1994). "The effects of branquial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." Journal of Experimental Biology, **197**: 47-63.
- Blanco, G.; Koster, J. C.; Sanchez, G. e Mercer, R. W. (1995). "Kinetic properties of the alpha2.beta1 and alpha2.beta2. isoenzymes of the Na,K-ATPase." Biochemistry, **34**: 319-325.
- Bond, C. E. (2006). Biology of Fishes, Saunders College Publishing, USA: 750.
- Bradley, T. J. (2009). Animal Osmoregulation. Oxford, Oxford university press.
- Breseghele, L.; Cardoso, M. P.; Borges-De-Oliveira, R.; M.F., d. C.; Barreto, J. C. B. e al., e. (2004). "Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*)." Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, **41**: 274-280.
- Brodeur, J. C.; Svartz, G.; Perez-Coll, C. S.; Marino, D. J. G. e Herkovits, J. (2009). "Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tal resorption." Aquatic Toxicology, **91**: 161-170.
- Brunelli, E.; Mauceri, A.; Maisano, M.; Bernabo, I.; Giannetto, A.; De Domenico, E.; Corapi, B.; Tripepi, S. e Fasulo, S. (2001). "Ultrastructural and immunohistochemical investigation on the gills of the teleost, *Thalassoma pavo* L., exposed to cadmium." Acta Histochemica, **113**(2): 201-213.
- Bystriansky, J. S. e Ballantyne, J. S. (2007). "Gill Na⁺-K⁺-ATPase activity correlates with basolateral membrane lipid composition in seawater- but not freshwater-acclimated Arctic char (*Salvelinus alpinus*). ." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **292**: R1043-R1051.
- Cajaraville, M. P.; Bebianno, M. J.; J., B.; C., P.; Sarasquete, C. e A., V. (2000). "The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach." Science of the Total Environment, **247**: 201-212.
- Carfagna, M. A.; Ponsler, G. D. e Muhoberac, B. B. (1996). "In ihibition of ATPase activity in rat synaptic plasma membranes by simultaneous exposure to metals. ." Chemico-Biological Interactions, **100**: 53-65.
- Cerejeira, M. J.; Viana, P.; Pereira, T.; Silva, E.; Valério, M. J.; Silva, A.; Ferreira, M. e Silva-Fernandes, A. M. (2003). "Pesticides in Portuguese surface and ground waters." Water Research, **37**: 1055-1063.
- Cerqueira, C. C. C. e Fernandes, M. N. (2002). "Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. ." Ecotoxicology and Environmental Safety, **52**(2): 83-91.
- Chapman, R. N. e Stranger, J. W. (1992). Horticultural pesticide residues in water: a review of potencial for water contamination by pesticides used in the vegetable industry in Victoria. Department of food and agriculture. Melbourne: 137.
- Cotou, E.; Vagia, C.; Rapti, T. e Roussis, V. (2001). "Metallothionein levels in *Callista chione* and *Venus verrucosa* from two areas of Eastern Mediterranean (Greece). ." Zeitschrift für Naturforschung, **56**: 848-852.

- Coutinho, C. e Gokhalr, K. S. (2000). "Selected oxidative enzymes and histopathological changes in the gills of *Cyprinus carpio* and *Oreochromis mossambicus* cultured in secondary sewage effluent. ." Water Research, **34**: 2997 - 3004.
- Coutinho, C. F. B.; Tanimoto, S. T.; Galli, A.; Garbellini, G. S.; Takayama, M.; Amaral, R. B.; Mazo, L. H.; Avaca, L. e Machado, S. A. S. (2005). "Pesticidas: mecanismo de acao, degradacao e toxicidade." Pesticidas: revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, **15**: 65-72.
- Crambert, G.; Schaer, D.; Roy, S. e Geering, K. (2004). "New molecular determinants controlling the accessibility of ouabain to its binding site in human Na,K-ATPase alpha isoforms." Molecular Pharmacology, **65**: 335-341.
- Crockett, E. L. (1999). "Lipid restructuring does not contribute to elevated activities of Na⁺/K⁺-ATPase in basolateral membranes from the gill of seawater acclimated eel (*Anguilla rostrata*)." Journal of Experimental Biology, **202**: 2385-2392.
- Crockett, E. L. e Hazel, J. R. (1995). "Sensitive assay for cholesterol in biological membranes reveals membrane-specific differences in kinetics of cholesterol oxidase. ." Journal of Experimental Zoology, **271**: 190-195.
- Crockett, E. L. e Hazel, J. R. (1997). "Cholesterol affects physical properties and (Na,K)-ATPase in basolateral membranes of renal and intestinal epithelia from thermally acclimated rainbow trout. ." Journal of Comparative Physiology B, **167**: 344-351.
- Croyle, M. L.; Woo, A. L. e Lingrel, J. B. (1997). "Extensive random mutagenesis analysis of the Na/K-ATPase alpha subunit identifies known and previously unidentified amino acid residues that alter ouabain sensitivity-implications for ouabain binding." European Journal of Biochemistry, **248**: 488.
- Dang, Z.; Lock, R. e Flik, G. (1999). "Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water." American Journal of Phisiology, **277**: 320-331.
- Davies, P. E.; Cook, L. S. J. e Barton, J. L. (1994). "Triazine herbicide contamination of Tasmanian streams: sources, concentrations and effects on biota. ." Australian Journal Marine Freshwater research, **45**: 209-26.
- Dawson, H. A.; Quintella, B. R.; Almeida, P. R.; Treble, A. J. e Jolley, J. C. (2015). The ecology of larval and metamorphosing lampreys. Lampreys: Biology, Conservation and Control. M. F. Docker, Springer Fish and Fisheries Series, USA: 75-137.
- Dempson, J. B. e Potter, T. R. (1993). "Ocurrance of sea lamprey, *Petromyzon marinus*, in Newfoundland river, with additional records from the northwest Atlantic." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **50**: 1265-1269.
- DGAV (2014). Decreto-Lei nº 306/2007 - Qualidade da água. D. d. S. d. M. d. D. Sanitária. Lisboa.
- Doadrio, I. (2001). Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. I. Doadrio. Madrid, Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Economidis, P. S.; Kallianiotis, A. e Psaltopoulou, H. (1999). "Two records of sea lamprey from the north Aegean sea." Journal of Fish Biology, **55**: 1114-1118.
- Ehrenfeld, J. e Klein, U. (1997). "The key role of the H⁺ V-ATPase in acid-base balance and Na⁺ transport processes in frog skin." Journal of Experimental Biology, **200**: 247-256.
- Eisler, R. (1989). "Atrazine hazards to fish, wildlife and vertebrates: a synotic review." Unated States of Fish and Wildlife Service Biology Reports, **85**: 1-18.
- Eriksson, Ö.; Mayer-Gostan, N. e Wistrand, P. (1985). "The use of isolated fish opercular epithelium as a model tissue for studying intrinsic activities of loop diuretics." Journal Acta Physiologica Scandinavica, **125**: 55-66.
- Erkmen, B. e Kolankaya, D. (2000). "Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. ." Bulletin of Enviromental Contaminat Toxicology, **64**.

- Evans, D. H.; Piermarini, P. M. e Choe, K. P. (2005). "The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste." Physiology Reviews, **85**: 97-177.
- Farmer, J. G. (1980). "Biology and physiology of feeding in adults lampreys." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **37**: 1751-1761.
- Fernandes-Castilho, M.; Gonçalves de Freitas, E.; Giaquinto, P. C.; Freitas de Oliveira, C. P.; Almeida-Val, V. M. e Val, A. L. (2007). Behavior and adaptation of air-breathing fishes. Fish respiration and environment. M. Fernandes, Rantin, F., Glass, M.L., Kapoor, B.G. . Boca Raton, Estados Unidos da América, CRC Press: 121-146.
- Fernandes, M. N. e Mazon, A. F. (2003). Environmental pollution and gill morphology. Fish adaptations. A. L. Val e B. G. Kapoor. Estados Unidos da América, Science Publishers: 203 - 231.
- Fisher-Scherl, T.; Veaser, A.; Hoffmann, R. W.; Kuhnhauser, C.; Negele, R. D. e Ewringmann, T. (1991). "Morphological effect of acute and chronic atrazine exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). ." Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **20**: 454-461.
- Flores-Lopes, F. e Thomaz, A. T. (2011). "Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring. ." Brazilian Journal of Biology, **71**(1): 179-188.
- Foskett, J. K. e Machen, T. E. (1985). "Vibrating probe analysis of teleost opercular epithelium: correlation between active transport and leak pathways of individual chloride cells." Journal of Membranes Biology, **85**: 25-35.
- Foskett, J. K. e Scheffey, C. (1982). "The chloride cell: definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. ." Science of the Total Environment, **215**: 164-166.
- Freyof, J. (2002). Freshwater fish diversity in Germany, threats and species extinction. Freshwater fish conservation: options for the future. M. J. Collares-Pereira; M. M. Coelho e I. G. Cowx. Oxford, Fishing News Books: Blackwell Science: 3-22.
- Garcia-Santos, S.; Fontainhas-Fernandes, A. e Wilson, J. M. (2006). "Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: Assessment of some ionoregulatory parameters. ." Environmental Toxicology, **21**(6): 33-46.
- Giari, L., Simoni, E., Manera, M., Dezfulli, B.S. (2008). "Histo-cytological responses of *Dicentrarchus labrax* (L.) following mercury exposure." Ecotoxicology and Environmental Safety, **70**(3): 400-410.
- Gibbs, A. e Somero, G. N. (1990). "Pressure adaptation of teleost gill Na/K-adenosine triphosphatase: role of the lipid and protein moieties." Journal of Comparative Physiology B, **160**: 431-439.
- Giddings, J. M.; Anderson, T. A.; Hall, L. W.; Kendall, R. J.; Richards, R. H.; Solomon, K. R. e Williams, W. M. (2005). A probabilistic aquatic ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Pensacola, Setac Press.
- Graymore, M.; Stagniti, F. e Allinson, G. (2001). "Impacts of atrazine in aquatic ecosystems." Environment International, **26**: 483-495.
- Grisham, C. M. e Barnett, R. E. (1973). "The role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium + potassium) adenosine triphosphatase. ." Biochemistry, **12**: 2635-2637.
- Hair, J. F.; Anderson, R. L.; Tatham, R. L. e Black, W. C. (1998). Multivariate Data Analysis. Upper Saddle River, USA, Prentice Hall.
- Hall, J. C.; Van Deynze, T. D.; Struger, J. e Chan, C. H. (1993). "Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4-D." Journal of Environmental Sciences of Health, **28**: 577-598.
- Halliday, R. G. (1991). "Marine distribution of the sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the northwest Atlantic." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **48**: 832-842.
- Hardisty, M. W. (1979). Biology of the Cyclostomes. Londres, Chapman & Hall.
- Hardisty, M. W. (1986a). General introduction to lampreys. The freshwater fishes of Europe - Petromyzontiformes. J. Holčík. Wiesbaden, Aula-verlag, **1**.

- Hardisty, M. W. (1986b). *Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758. The freshwater fishes of Europe. Petromyzontiformes. J. Holčík. Wiesbaden, Aula-Verlag, **1**: 94-116.
- Hardisty, M. W. (1986c). *Lampetra fluviatilis* Linnaeus, 1758. The freshwater fishes of Europe. Part I - Petromyzontiformes. J. Holčík. Wiesbaden, Aula-Verlag, **1**: 249-278.
- Hardisty, M. W. e Potter, I. C. (1971a). The behaviour, ecology and growth of larval lampreys. The Biology of Lampreys. M. W. Hardisty e I. C. Potter. London, Academic Press, **1**: 85-125.
- Hardisty, M. W. e Potter, I. C. (1971b). The general biology of adult lampreys. The biology of lampreys. M. W. Hardisty e I. C. Potter London, Academic Press, **1**: 127-206.
- Harper, C. e Wolf, J. C. (2009). "Morphologic Effects of the Stress Response in Fish. ." ILAR Journal, **50**(4): 387-396.
- Harvey, B. J. e Ehrenfeld, J. (1986). "Regulation of intracellular sodium and pH by the electrogenic H⁺ pump in frog skin. ." Pflügers Archiv European Journal of Physiology **406**: 362-366.
- Harvey, B. J.; Thomas, R. e Ehrenfeld, J. (1988). "Intracellular pH controls cell membrane Na⁺ and K⁺ conductances and transport in frog skin epithelium. ." The Journal of General Physiology, **92**: 767-791.
- Hazel, J. R. (1995). "Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation?" Annual Review of Physiology, **57**(1): 19-42.
- Heath, A. G. (1987). Water Pollution and Fish Physiology. Florida, Estados Unidos da América, CRC press: 245.
- Hinton, D. E.; Baumann, P. C.; Gardner, G. R.; Hawkins, W. E.; Hendricks, J. D.; Murchelano, R. A. e Okihira, M. S. (1992). Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, Lewis Publishers: 155-196.
- Holčík, J.; Delic, A.; Kucinic, M.; Buhvic, V. e Vater, M. (2004). "Distribution and morphology of the sea lamprey from the Balkan coast of the Adriatic Sea." Journal of Fish Biology, **64**: 514-527.
- Horisberger, J. D. (2004). "Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump." Physiology (Bethesda), **19**: 377-387.
- Hostovsky, M.; Blahova, J.; Plhalova, L.; Kopriva, V. e Zdenka Svobodova, Z. (2014). "Effects of the exposure of fish to triazine herbicides." Neuroendocrinology Letters, **35**: 2-35.
- Howard, P. H. (1991). Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals., Lewis.
- Huggett, R. J.; Kimerle, R. A.; Mehrle, J. P. M. e Bergman, H. L. (1992). Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton, Lewis: 346.
- Hussein, S. Y.; El-Nasser, M. A. e Ahmed, S. M. (1996). "Comparative studies on the effects of the herbicide atrazine on freshwater fish *Oreochromis niloticus* and *Chrysichthyes auratus* at Assiut, Egypt. ." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, **57**: 503-510.
- ICN (2006). Fauna, peixes. Plano Sectorial da Rede Natura 2000. Lisboa, Instituto da Conservação da Natureza: .
- INAG (2000). Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Lima. Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, **I**.
- INAG (2012). Plano de Bacia Hidrográfica do Rio Lima. Lisboa, Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território, **I**.
- Irving, E. C.; Baird, D. J. e Culp, J. M. (2003). "Ecotoxicological responses of the mayfly *Baetis tricaudatus* to dietary and waterborne cadmium: implications for toxicity testing." Environmental Toxicology and Chemistry, **22**: 1058-1064.
- Janvier, P. (2007). Living primitive fishes and fishes from deep time. San Diego, *Primitive Fishes.*, Academic Press.
- Jorgensen, P. L.; Hakanson, K. O. e Karlsh, S. J. D. (2003). "Structures and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions." Annual Review of Physiology, **65**: 817-849.
- Kantham, K. P. e Richards, R. H. (1995). "Effect of buffers on the gill structure of common carp, *Cyprinus carpio* and rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*). ." Journal of Fish Diseases, **18**: 411-423.

- Kaplan, J. H. (2002). "Biochemistry of Na,K-ATPase." Annual Review of Biochemistry, **71**: 511-535.
- Karan, V.; Vtorovic, S.; Tutundzic, V. e Poleksic, V. (1998). "Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery." Ecotoxicology and Environmental Safety, **40**: 49 - 55.
- Karlsson-Norrgrén, L.; Runn, P. e Haux, C. (1985). "Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson." Journal of Fish Biology, **27**: 81-95.
- Karnaky, K. J.; Ernst, S. A. e Philpott, C. W. (1976a). "Teleost chloride cell. I. Response of pupfish *Cyprinodon variegatus* gill Na,K-ATPase and chloride cell fine structure to various high salinity environments." Journal Cellular Biology, **70**: 144-156.
- Karnaky, K. J.; Kinter, L. B.; Kinter, W. B. e Stirling, C. E. (1976b). "Teleost chloride cell. II. Autoradiographic localization of gill Na, K-ATPase in killifish *Fundulus heteroclitus* adapted to low and high salinity environments. ." Journal Cellular Biology, **70**: 157-177.
- Ketata, I.; Denier, X.; Hamza-Chaffai, A. e Minier, C. (2008). "Endocrine-related reproductive effects in molluscs." Comparative Biochemistry and Physiology, **147**: 261-270.
- Kimelberg, H. K. e Papahadjopoulos, D. (1974). "Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions and cholesterol on (Na/K)-stimulated adenosine triphosphatase. ." Journal of Biology Chemistry, **249**: 1071-1080.
- Kirschner, L. B. (1983). "Sodium chloride absorption across the body surface: frog skins and other epithelia." American Journal Physiology, **244**: 429-443.
- Lam, P. K. S. e Gray, J. S. (2003). "The use of biomarkers in environmental monitoring programmes." Marine Pollution Bulletin, **46**: 182-186.
- Lança, M. J.; Machado, M.; Ferreira, A. F.; Quintella, B. R. e Almeida, P. R. (2015). "Structural lipid changes and Na⁺/K⁺-ATPase activity of gill cells' basolateral membranes during saltwater acclimation in sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.) juveniles." Comparative Biochemistry and Physiology A, **189**: 67-75.
- Lança, M. J.; Rosado, C.; Machado, M.; Ferreira, R.; Alves-Pereira, I.; Quintella, B. R. e Almeida, P. R. (2011). "Can muscle fatty acid signature be used to distinguish diets during the marine trophic phase of sea lamprey (*Petromyzon marinus*, L.)? ." Comparative Biochemistry and Physiology, **159B**: 26-39.
- Larsen, E. H. (1991). "Chloride transport by high-resistance heterocellular epithelia." Physiology Reviews, **71**: 235-283.
- Larsen, L. O. (1980). "Physiology of adult lampreys, with special regard to natural starvation, reproduction, and death after spawning." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **37**: 1762-1779.
- Laura, D.; De Socio, G.; Frassanito, R. e Rostilio, D. (1996). "Effects of atrazine on *Ochrobactrum anthropi* membrane fatty acids." Applied Microbiology and Biotechnology, **62**(7): 2644-2646.
- Laurent, P. e Perry, S. F. (1991). "Environmental effects on fish gill morphology." Physiological Zoology, **64**: 4-25.
- Le Blanc, P. J.; Gills, T. E.; Gerrits, M. F. e Ballantyne, J. S. (1995). "Metabolic organization of liver and somatic muscle of landlocked sea lamprey *Petromyzon marinus* during spawning migration." Canadian Journal of Zoology, **73**: 916-923.
- Lelek, A. (1987). "The Freshwater Fishes of Europe." Threatened Fishes of Europe, **9**: 343.
- Li, W.; Scott, A. P.; Siefkes, M. J.; Yan, H.; Liu, Q.; Yun, S. e Gage, D. (2002). "Bile acid secreted by male sea lamprey that acts as a sex pheromone." Science, **296**: 138-141.
- Lin, T.; Wen, Y.; Jiang, L.; Yang, S. e Zhou, Q. (2008). "Study of atrazine degradation in subsurface flow constructed wetland under different salinity." Chemosphere, **72**: 122-128.
- Lin, Y.; Stormo, G. D. e Taghert, P. H. (2004). "The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system." Journal of Neuroscience, **24**: 7951-7957.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. e Randall, R. J. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent. ." Journal of Biology Chemistry, **192**: 265-275.

- Lusk, S.; Lusková, K.; Halacka, S.; Slechta, S. e Slechtová, V. (2002). Status and protection of species and intraspecific diversity of the ichthyofauna in the Czech Republic. Freshwater fish conservation: options for the future. M. J. Collares-Pereira; M. M. Coelho e I. G. Cowx. Oxford, Fishing News Books, Blackwell Science: 23-33.
- Machado, M. R. (1999). "Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas." UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, 1: 63-76.
- Maitland, P. S. (1980). "Review of the ecology of lampreys in northern Europe." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37: 1944-1952.
- Maitland, P. S. (2003). Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey. Conserving Natura 2000. Peterborough, English Nature.
- Mallat, J. (1985). "Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 42: 630-648.
- Marshall, W. S.; Bryson, S. E.; Darling, P.; Whitten, C.; Patrick, M.; Wilkie, M.; Wood, C. M. e Buckland-Nicks, J. (1997). "NaCl transport and ultrastructure of opercular epithelium from a freshwater-adapted euryhaline teleost, *Fundulus heteroclitus*." Journal of Experimental Biology, 277: 213-237.
- Martinez, C. B. R. e Sousa, M. M. (2002). "Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species." Comparative Biochemistry and Physiology, 133A: 151-160.
- Mateus, C. S.; Alves, M. J.; Quintella, B. R. e Almeida, P. R. (2013). "Three new cryptic species of the lamprey genus *Lampetra* Bonnaterre, 1788 (Petromyzontiformes: Petromyzontidae) from the Iberian Peninsula." Contributions to Zoology, 82: 37-53.
- Mazon, A. F.; Cerqueira, C. C. e Fernandes, M. N. (2002). "Gill cellular changes induced by copper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*." Environmental Research Section A, 88: 52 - 63.
- McDonald, D. G. e Wood, C. M. (1993). Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. Fish ecophysiology. London, Chapman & Hall: 297-321.
- Mela, M.; Guiloski, I. C.; Doria, H. B.; Randi, M. A. F.; de Oliveira Ribeiro, C. A.; Pereira, L.; Maraschi, A. C.; Prodocimo, V.; Freire, C. A. e Silva de Assis, H. C. (2013). "Effects of the herbicide atrazine in neotropical cat fish (*Rhamdia quelen*)." Ecotoxicology and Environmental Safety, 93: 13-21.
- Monserrat, J. M.; Martínez, P. E.; Geracitano, L. A.; Amado, L. L.; Martins, C. M.; Pinho, G. L.; I.S., C.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, L. e Bianchini, A. (2007). "Pollution biomarkers in estuarine animals: critical review and new perspectives." Comparative Biochemistry and Physiology, 146(1-2): 221-234.
- Moore, A.; Lower, N.; Mayer, I. e Greenwood, L. (2007). "The impact of a pesticide on migratory activity and olfactory function in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts." Aquaculture, 273: 350-359.
- Moore, A. e Waring, C. P. (1998). "Mechanistic effects of a triazine pesticide on reproductive endocrine function in mature male Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Parr." Pesticide Biochemistry and Physiology, 62: 41-50.
- Morman, R. H.; Cuddy, D. W. e Rugen, P. C. (1980). "Factors influencing the distribution of sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the Great Lakes." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37: 1811-1826.
- Morris, R. (1956). "The osmoregulation ability of the lampern (*Lampetra fluviatilis* L.) in sea water during the course of its spawning migration." Journal of Experimental Biology, 23: 235-248.
- Morris, R. (1957). "Some aspects of the structure and cytology of the gills of *Lampetra fluviatilis*." Quarterly Journal of Microscopical Science, 98: 473-485.
- Morris, R. (1972). Osmoregulation. The Biology of Lampreys. W. M. Hardisty e I. C. Potter. London, Academic Press, 2: 192-239.
- Morris, R. (1980). "Blood composition and osmoregulation in ammocoete larva." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 37: 1665-1679.

- Morris, R. e Pickering, A. D. (1976). "Changes in the ultrastructure of the gills of the river lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L.), during the anadromous spawning migration. ." Cell and Tissue Research, **173**: 271-277.
- Morrison, J. F.; Guynn, S. R.; Scofield, M. A.; Dowd, F. J. e Petzel, D. H. (2006). "Warm acclimation changes the expression of the Na⁺/K⁺-ATPase α -subunit isoforms in Antarctic fish gills." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, **333**: 129-139.
- Morrison, W. R. e Smith, L. M. (1964). "Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos e dimetil acetais de lípidios com trifluoreto de boro-metanol." Journal of Lipid Research, **5**: 600-608.
- Nagel, W. e Dörge, A. (1996). "The role of mitochondria-rich cells in sodium transport across amphibian skin. ." Pflügers Archiv European Journal of Physiology, **433**: 146-152.
- Neskovic, N. K.; Elezovic, I.; Karan, V.; Poleksic, V. e Budimi, M. (1993). "Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.)." Ecotoxicology Environment Safety, **25**: 173-182.
- Novartis (2000). Summary of environmental fate of atrazine. Greensboro, Novartis Crop Protection.
- Nwani, C. D.; Lakra, W. S.; Nagpure, N. S.; Kumar, R.; Kushwaha, B. e Srivastava, S. K. (2010). "Toxicity of the herbicide atrazine: Effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch)." International Journal of Environmental Research and Public Health: 3298-3312.
- Ogundiran, M. A.; Fawole, O. O.; Adewoye, S. O. e Ogundiran, T. A. (2009). "Pathologic lesions in the gills of *Clarias gariepinus* exposed to sublethal concentrations of soap and detergent effluents." Journal of Cell and Animal Biology, **3**(5): 78-82.
- Pampanin, D. M.; Maragon, I.; Volpato, E.; Campesan, G. e Nasci, C. (2005). "Stress biomarkers and alkali-labile phosphate level in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) collected in the urban area of Venice (Venice Lagoon, Italy)." Environmental Pollution, **136**: 103-107.
- Parvez, S.; Sayeed, I. e Raisuddin, S. (2006). "Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. ." Ecotoxicology of Environment Safety, **65**: 62-66.
- Paula, S.; Tabet, M. R. e Ball, W. J. (2005). "Interactions between cardiac glycosides and sodium/potassium-ATPase: three-dimensional structure-activity relationship models for ligand binding to the E2-Pi form of the enzyme versus activity inhibition." Biochemistry, **44**: 498-510.
- Paulino, M. G.; Sakuragui, M. M. e Fernandes, N. N. (2012). "Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*." Chemosphere, **86**(1): 1-7.
- Peakall, D. B. (1994). "The role of biomarkers in environmental assessment. ." Ecotoxicology **3**: 157-160, 173-179.
- Pearce, W. A.; Braem, R. A.; Dustin, S. M. e Tibbles, J. J. (1980). "Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in the Lower Great Lakes." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **37**: 1802-1810.
- Peek, W. D. e Youson, J. H. (1979a). "Ultrastructure of chloride cells in young adults of the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L., in fresh water and during adaptation to sea water." Journal of Morphology, **160**: 143-163.
- Peek, W. D. e Youson, J. H. (1979b). "Ultrastructure of chloride cells in young adults of the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L., in fresh water and during adaptation to sea lamprey." Journal of Morphology, **160**: 143-163.
- Pérez, J.; Loureiro, S.; Menezes, S.; Palama, P.; Fernandes, R.; Barbosa, I. e Soares, A. (2009). "Estudo científico revela que a água do Alqueva é tóxica." Público.
- Perry, S. F. (1997). "The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. ." Annual Review of Physiology, **59**: 325-347.
- Peters, J. W. e Cook, R. M. (1973). "Effects of atrazine on reproduction in rats." Bulletin of Environmental Contaminat Toxicology, **9**: 301-304.
- Pickering, A. D. e Morris, R. (1970). "Osmoregulation of *Lampetra fluviatilis* L. and *Petromyzon marinus* (Cyclostomata) in hyperosmotic solutions." Journal of Experimental Biology, **53**: 231-243.

- Pisam, M. e Rambourg, A. (1991). "Mitochondria-rich cells in the gill epithelium of teleost fishes: an ultrastructural approach." International Reviews of Cytology, **130**: 191-232.
- Poleksic, V. e Mitrovic-Tutundzic, V. (1994). Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. R. Muller e R. Lloyd. Oxford, Fishing News Books: 339-352.
- Potter, I. C. e Beamish, F. W. H. (1977). "The freshwater biology of adult anadromous sea lampreys *Petromyzon marinus*." Journal of Zoology, **181**: 113-130.
- Povz, M. (2002). Status of the freshwater fishes and lampreys in Slovenia. Freshwater fish conservation: options for the future. M. J. Collares-Pereira; M. M. Coelho e I. G. Cowx. Oxford, Fishing New Books, Blackwell Science: 45-54.
- Pratap, H. B. e Wendelaar Bonga, S. E. (1993). "Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and sodium, potassium-ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. ." Aquatic Toxicology, **26**: 133-150.
- Qiu, L. Q.; Koenderink, J. B.; Swarts, H. G. P.; Willems, P. H. G. M. e De Pont, J. J. H. H. M. (2003). "Phe783, Thr797, and Asp804 in transmembrane hairpin M5-M6 of Na⁺,K⁺-ATPase play a key role in ouabain binding." The Journal of Biological Chemistry, **278**: 47240-47244.
- Quintella, B. R. (2006). Biologia e conservação da lampreia-marinha (*Petromyzon marinus* L.). Departamento de Biologia Animal. Departamento de Biologia Animal. Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências. Lisboa.281.
- Quintella, B. R.; Andrade, N. O. e Almeida, P. R. (2003). "Distribution, larval stage duration and growth of the sea lamprey ammocoetes, *Petromyzon marinus* L., in a highly modified river basin." Ecology of Freshwater Fish, **12**: 1-8.
- Rand, G. M. (1995). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment... Washington, Taylor & Francis.
- Readman, J. W.; Albanis, T. A.; Barcelo, D.; Galassi, S.; Tronczynski, J. e Gobiellides, G. P. (1993). "Herbicide contamination of Mediterranean estuarine waters: results from a Med Pol pilot survey." Marine Pollution Bulletin, **26**: 609-613.
- Reis-Santos, P.; McCormick, S. D. e Wilson, J. M. (2008). "Ionoregulatory changes during metamorphosis and salinity exposure of juvenile sea lamprey (*Petromyzon marinus* L.). ." Journal of Experimental Biology, **211**: 978-988.
- Renaud, C. B. (1997). "Conservation status of Northern Hemisphere lampreys (*Petromyzontidae*)." Journal of Applied Ichthyology, **13**: 143-148.
- Rogado, L.; Alexandrino, P.; Almeida, P. R.; Alves, J.; Bochechas, J.; Cortes, R.; Domingos, I.; Felipe, F.; Madeira, J. e Magalhães, F. (2005). Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Vol. II - Peixes Dulciaquícolas e Migradores. Lisboa, Serviço Nacional de Parques, Reservas e Conservação da Natureza.
- Roy, R. N.; Vogel, K. M.; Moore, C. P.; Pearson, T.; Roy, L. N.; Johnson, D. A.; Millero, F. J. e Campbell, D. M. (1993). "The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45°C." Marine Chemistry, **44**: 249-267.
- Sancho, E. e Ferrando, M. D. (1997). "Inhibition of Gill Na⁺,K⁺-ATPase Activity in the Eel, *Anguilla anguilla*, by Fenitrothion." Ecotoxicology Environment Safety, **38**: 132-136.
- Schlenk, A.; Stresser, D. M.; Rimoldi, J.; Arcand, L.; McCants, J.; Nimrod, A. C. e Benson, W. H. (1998). "Biotransformation and estrogenic activity of methoxychlor and its metabolites in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)." Marine Environmental Research, **46**: 159.
- Schmidt-Nielsen, K. (1996). Fisiologia animal-adaptação e meio ambiente. São Paulo: Santos.
- Schottler, S. P.; Eisenreich, S. J. e Capel, P. D. (1994). "Atrazine, alachor and cyanazine in a large river system." Environmental Sciences Technology, **28**: 1079-1089.

- Schwaiger, J.; Wanke, R.; Adam, S.; Pawert, M.; Honnen, W. e Triebkorn, R. (1997). "The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish." Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, **6**: 75-86.
- Silva, S.; Servia, M. J.; Vieira-Lanero, R.; Barca, S. e Cobo, F. (2013). "Life cycle of the sea lamprey *Petromyzon marinus*: duration of and growth in the marine life stage." Aqua Biology, **18**: 59-62.
- Skou, J. C. (1988). Overview: The Na,K-pump. Methods in Enzymology. S. F. a. B. Fleischer. London, Academic Press, **156**: 1-25.
- Smith, B. R. (1971). Sea lamprey in the Great Lakes of North America. The biology of lampreys. M. W. Hardisty e I. C. Potter London, Academic Press, **1**: 207-247.
- Smith, B. R. e Tibbles, J. J. (1980). "Sea lamprey (*Petromyzon marinus*) in Lakes Huron, Michigan and Superior: history of invasion and control, 1936-78." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **37**: 1780-1801.
- Snirh. (2012). "Sistema Nacional de Informação de Recursos Hídricos." Retrieved 5 de Março de 2012, from <http://snirh.pt/index.php?idMain=2&idItem=1>.
- Solomon, K. R.; Carr, J. A.; Du Preez, L. H.; Giesy, J. P.; Smith, E. E.; Kendall, R. J. e Van Der Kraak, G. J. (2008). "Effects of atrazine on fish, amphibians and aquatic reptiles: a critical review." Critical Reviews in Toxicology, Informa Healthcare, **38**: 721-772.
- Staurens, M.; Rainuzzo, R.; Sigholt, T. e Jorgensen, L. (1994). "Acclimation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to cold water: stress response, osmoregulation, gill lipid composition and gill Na⁺K⁺-ATPase activity. ." Comparative Biochemistry and Physiology, **109**: 413-421.
- Steinberg, C. E. W.; Lorenz, R. e Spieser, O. H. (1995). "Effects of atrazine on swimming behavior of zebrafish, *Brachydanio rerio*. ." Water Research, **29**: 981-985.
- Takao, K. (1985). "Thermodynamic analysis of muscle ATPase mechanisms." Physiology Reviews, **65**: 467.
- Takashima, F. e Hibiya, T. (1995). An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features. 2ndedn. Tokio, Lubrecht and Cramer Ltd: 213.
- Temmink, J.; Bouwmeister, P. e De Jong, P. (1983). "An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Aquatic Toxicology, **4**: 165-179.
- Therien, A. G. e Blostein, R. (2000). "Mechanisms of sodium pump regulation." American Journal of Physiology, **279**: 541-566.
- Thophon, S.; Kruatrachue, M.; Upatham, E. S.; Pokethitiyook, P.; Sahaphong, S. e Jaritkhuan, S. (2003). "Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcalifer*, in acute and subchronic cadmium exposure." Environmental Pollution, **121**: 307-320.
- Torres, D. L. F. F. e Christofolletti, C. S. F. (2008). Análise de Brânquias de *Oreochmis niloticus* (Pisces) Residentes em Ambiente Lêntico Impactado. Instituto de Biociências. Instituto de Biociências. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Rio Claro.39.
- Van der Oost, R.; Beyer, J. e Vermeulen, N. P. E. (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. ." Environmental Toxicology and Pharmacology, **13**: 57-149.
- Viarengo, A.; Lowe, D.; Bolognesi, C.; Fabbri, E. e Koehler, A. (2007). "The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms." Comparative Biochemistry and Physiology, **146**(3): 281-300.
- Wade, J. B.; Di Scala, V. A. e Karnovsky, M. J. (1975). "Membrane structural specialization of the toad urinary bladder revealed by the freeze fracture technique. I. The granular cell. ." The Journal of Membrane Biology, **22**: 385-402.
- Walker, C. H.; Hopkin, S. P.; Siby, R. M. e Peakall, D. B. (1996). Principles of ecotoxicology. Londres, Taylor & Francis.
- Waring, C. P. e Moore, A. (2004). "The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. ." Aquatic Toxicology, **66**: 93-104.

- Wendelaar Bonga, W. S. E. e Lock, R. A. C. (1992). "Toxicants and osmoregulation in fish." Netherlands Journal of Zoology, **42**: 478-493.
- Wester, P. W.; Van der Ven, L. T. M.; Vethaak, A. D.; Grinwis, G. C. M. e Vos, J. G. (2002). "Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology." Environmental Toxicology and Pharmacology, **11**: 289-295.
- Wilkie, M. P. (2001). Lampreys: Energetics and Development. Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. A. P. Farrel, Cech, J. J., Richards, J. G. & Stevens, E. D. , Academic Press.
- Wilson, J. M. e Laurent, P. (2002). "Fish gill morphology: inside out." Journal of Experimental Biology, **293**(3): 192-213.
- Winkaler, E. U.; Silva, A. G.; Galindo, H. C. e Martinez, C. B. d. R. (2001). Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. Maringá, Acta Scientiarum. **23**.
- Winkelman, D. A. e Klaine, D. J. (1991). "Degradation and bound residue formation of four atrazine metabolites, deethylatrazine, deisopropylatrazine, dealkylatrazine and hydroxyatrazine, in a western Tennessee soil." Environmental Toxicology and Chemistry, **10**: 347-354.
- Young, R. J.; Kelso, J. R. M. e Weise, J. G. (1990). "Occurrence, relative abundance, and size of landlocked sea lamprey (*Petromyzon marinus*) ammocoetes in relation to stream characteristics in the Great Lakes." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, **47**: 1773-1778.
- Youson, J. H. e Potter, I. C. (1979). "A description of the stages of metamorphosis in the anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L." Canadian Journal of Zoology, **57**: 1808-1817.
- Zorita, I.; Ortiz-Zarragoitia, M.; Apraiz, I.; Cancio, I.; Orbea, A.; Soto, M.; Marigomez, I. e Cajaraville, M. P. (2008). "Assessment of biological effects of environmental pollution along the NW Mediterranean Sea using red mullets as a sentinel organisms." Environmental Pollution, **153**(1): 157-168.