

LUCAS MARCON

**EFEITOS DO THIODAN[®] EM FÍGADO E EM OVÁRIOS EM
MATURAÇÃO AVANÇADA DE LAMBARIS *Astyanax bimaculatus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

Marcon, Lucas, 1980-
M321e Efeitos do Thiodan® em fígado e em ovários em maturação
2013 avançada de lambaris *Astyanax bimaculatus* / Lucas Marcon. –
Viçosa, MG, 2013.
ix, 108 f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamim.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Lambari (Peixe) - Reprodução - Efeito da toxicologia ambiental. 2. Toxicologia ambiental. 3. Thiodan (Inseticida).
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 639.3748

LUCAS MARCON

**EFEITOS DO THIODAN[®] EM FÍGADO E EM OVÁRIOS EM
MATURAÇÃO AVANÇADA DE LAMBARIS *Astyanax bimaculatus***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA:

Profa. Dra. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Coorientadora)

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Prof. Dr. Nilo Bazzoli

Prof. Dr. José Domingos Guimarães

Prof. Dr. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus pais (Carlos e Narcisa), irmãos (Luciana e Lúcio), orientador (Laércio dos Anjos Benjamin) e minha namorada (Mirlaine Soares), por me incentivarem, acreditarem, confiarem, e sempre estarem ao meu lado demonstrando sugestões construtivas para a vida e para este trabalho.

Aos membros da banca examinadora dessa tese, pela disponibilidade e sugestões construtivas para enriquecimento desse trabalho.

À CAPES, FAPEMIG e Departamento de Veterinária/UFV, pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do presente estudo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária/UFV e Departamento de Morfologia - ICB/UFMG, pelos ensinamentos e paciência para concretização das técnicas utilizadas neste estudo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo e conviveram comigo ao longo desses anos em Viçosa-MG.

BIOGRAFIA

LUCAS MARCON, filho de Carlos Marcon Filho e Narcisa das Dores Marcon, nasceu em 29 de janeiro de 1980, em Campinas-SP.

Em fevereiro de 1999 ingressou no curso de Ciências Biológicas pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (PUC-Campinas), onde, em janeiro de 2003, graduou-se nesta Instituição. No ano de 2002 foi bolsista de iniciação científica pela FAPESP no Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia/UNICAMP.

Em maio de 2006 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa - MG, sob orientação do professor Laércio dos Anjos Benjamin, na linha de pesquisa Morfofisiologia de Animais Domésticos e Selvagens (Reprodução e Toxicologia de Peixes), defendendo a dissertação de mestrado em fevereiro de 2008 e tese de doutorado em dezembro de 2013, obtendo os títulos de *Magister Scientiae* e *Doctor Scientiae*.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1. O uso de agrotóxicos	1
1.2. Tipos de inseticidas	2
1.3. Inseticidas no meio ambiente: rotas de entrada	3
1.4. Avaliação de solubilidade e estudos de toxicidade aquática	4
1.5. Caracterização do agrotóxico Thiodan®	5
1.6. O uso do endosulfan	6
1.7. Toxicidade aguda do endosulfan	6
1.8. Efeitos dos inseticidas organoclorados sobre peixes	7
1.9. O lambari <i>Astyanax bimaculatus</i>	9
1.10. Morfologia hepática em teleósteos	10
1.11. Morfologia ovariana em teleósteos	12
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Animais	17
3.2. Agrotóxicos	18
3.3. Teste de toxidade aguda em sistema estático - CL ₅₀	18
3.4. Teste de toxidade subletal em sistema estático	20
3.5. Avaliação morfológica	21
3.5.1. Microscopia de luz	21
3.5.2. Análises morfológicas e morfométricas dos fígados	22
3.5.3. Análises morfológicas e morfométricas dos ovários	25
3.5.4. Imunoistoquímica	26
3.6. Parâmetros biométricos	27
3.7. Análises estatísticas	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. CAPÍTULO 1. Efeitos do inseticida Thiodan [®] sobre a morfologia hepática de fêmeas de lambaris <i>Astyanax bimaculatus</i>	35
Resumo	35
1. Introdução	36
2. Material e métodos	37
3. Resultados	42
4. Discussão	45
5. Referências bibliográficas	56
5.2. CAPÍTULO 2. Efeitos do inseticida Thiodan [®] sobre a morfologia do desenvolvimento folicular em lambaris <i>Astyanax bimaculatus</i>	62
Resumo	62
1. Introdução	63
2. Material e métodos	65
3. Resultados	68
4. Discussão	71
5. Referências bibliográficas	82
5.3. CAPÍTULO 3. Relação entre colágeno tipo IV, integrina $\beta 1$ e caspase 3 durante o desenvolvimento folicular em <i>Astyanax bimaculatus</i> expostos ao Thiodan [®]	86
Resumo	86
1. Introdução	87
2. Material e métodos	89
3. Resultados	92
4. Discussão	94
5. Referências bibliográficas	103
6. CONCLUSÕES	107

RESUMO

MARCON, Lucas, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2013. **Efeitos do Thiodan[®] em fígado e em ovários em maturação avançada de lambaris *Astyanax bimaculatus***. Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadoras: Ann Honor Munteer e Marlene Isabel Vargas Vilorio.

O agrotóxico Thiodan[®] (350g/L de endosulfan) é um inseticida organoclorado utilizado em diversas monoculturas que pode chegar aos ecossistemas aquáticos e afetar a reprodução e a integridade das populações de peixes. O fígado é um dos principais órgãos para a biotransformação de diversos xenobióticos. Quando os peixes são expostos a uma concentração elevada de agentes químicos podem ocorrer danos hepáticos. Os ovários de peixes apresentam folículos em diferentes estádios de desenvolvimento que são envoltos por zona radiata, células foliculares, membrana basal e células da teca, formando o complexo folicular. Agentes estressores podem causar aumento ou diminuição do diâmetro dos folículos vitelogênicos, alterar a quantidade de folículos nos diferentes estádios de desenvolvimento e aumentar a incidência de atresia. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos do Thiodan[®] sobre o fígado e ovários de lambaris *Astyanax bimaculatus* por meio de análises morfológica, morfométrica e imunoistoquímica. Os peixes expostos ao tóxico foram divididos em quatro experimentos: 1) sem aclimação e sem alimentação; 2) sem aclimação e alimentados; 3) com aclimação de 10 dias e sem alimentação; 4) com aclimação de 10 dias e alimentados. Em todos os experimentos foram utilizadas três concentrações diferentes do Thiodan[®] inferiores à CL₅₀ de 13,67µg/L pré-determinada em laboratório de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007). As concentrações utilizadas em cada experimento foram de 1,15; 2,3 e 5,6µg/L, além de um grupo controle livre de tóxico, com três repetições contendo 10 peixes para cada concentração. Após as 96h, seis peixes de cada grupo foram capturados e anestesiados com benzocaína (1:10.000), de acordo com as Normas da Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (protocolo 24/2009). Os fígados e ovários foram coletados e processados por técnicas histológicas rotineiras. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz Olympus CX31. Foram obtidas imagens digitais de 10 campos aleatórios por animal em objetiva de 20X e 40X para avaliação histológica. As características da água utilizada nos testes em sistema estático foram mantidas de acordo com as recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2007). A análise histológica dos fígados mostrou, no experimento 1 (sem

aclimação/sem alimentação), na concentração de 5,6µg/L de Thiodan[®], a menor intensidade (0,10±0,0) da reação ao PAS no citoplasma dos hepatócitos quando comparada ao grupo controle (1,33±0,51). No entanto, houve diferença (P<0,05) nesse mesmo experimento quando comparado com as concentrações 1,15µg/L (2,66±0,81) e 2,3µg/L (3,00±0,0) caracterizando depleção de glicogênio. Além disso, houve alterações do diâmetro de núcleos e citoplasma dos hepatócitos nos diferentes experimentos, e maior quantidade de núcleos de hepatócitos nos grupos expostos ao Thiodan[®] associada com a redução na quantidade de citoplasma. O Índice de Alteração Histológica (IAH) dos lambaris coletados manteve-se entre 4,33 a 8,33 (para os grupos controles); 18,50 a 28,83 (para as concentrações de 1,15µg/L); 20,33 a 28,33 (para as concentrações de 2,3µg/L) e 23,66 a 27,66 (para as concentrações de 5,6µg/L). Os lambaris coletados nos diferentes experimentos apresentaram valores de IAH para os grupos controle inferiores (P<0,05) aos grupos expostos. Estes resultados demonstraram que o Thiodan[®] pode estar influenciando as funções hepáticas pela maior mobilização das reservas de glicogênio na concentração 5,6µg/L. As alterações observadas nos fígados dos lambaris não foram severas, sendo alterações de estágio I e II, indicando dano reparável do tecido hepático nos diferentes grupos e experimentos. Nos ovários, percebeu-se que a ação do Thiodan[®] em níveis subletais não afetou a morfologia dos diferentes estádios de desenvolvimento folicular. Porém, os experimentos com aclimação demonstraram alterações nas quantidades de folículos primários e secundários quando comparados com os peixes dos experimentos sem aclimação. Além disso, houve aumento do número de folículos atresícos e diâmetro dos folículos secundários nos grupos expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos. Estes resultados sugerem mecanismos compensatórios da perda reprodutiva quando em meio com condições desfavoráveis. As análises imunoistoquímicas demonstraram marcação crescente e uniforme ao longo do desenvolvimento folicular para integrina β_1 e colágeno tipo IV. Entretanto, a caspase 3 foi observada somente no complexo folicular de folículos secundários, mesmo quando os peixes são expostos a diferentes concentrações de Thiodan[®], o que confirma a integridade das células foliculares e da via apoptótica caspase-3-dependente, a qual pode estar sendo ativada para futuros processos de regressão folicular.

ABSTRACT

MARCON, Lucas, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2013. **Effects of Thiodan[®] in liver and ovaries in advanced maturation of the lambari *Astyanax bimaculatus*.** Advisor: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisors: Ann Honor Mounteer and Marlene Isabel Vargas Vilorio.

The pesticide Thiodan[®] (350g.L⁻¹ of endosulfan) is an organochlorine insecticide used in various monocultures that may reach aquatic ecosystems and affect reproduction and the health of fish populations. The liver is a major organ for the biotransformation of many xenobiotics, and it can be damaged if the fish are exposed to a high level of chemical substances. The fish ovaries have oocytes at different stages of development that are surrounded by zona radiata, follicular basal membrane and teca cells to form the follicular complex. Stressor products may cause an increase or decrease in the diameter of the secondary follicles, vitellogenic depletion, a change the number of follicles at different stages of development and an increase the incidence of atresia. The present study aimed to evaluate the effects of Thiodan[®] on the liver and ovaries of *Astyanax bimaculatus* through morphological, morphometric and immunohistochemistry analysis. The groups of fish were exposed to the toxic substances divided in four experiments: without adaptation and no feeding, feeding without adaptation, with adaptation and no feeding, with adaptation and feeding. All experiments used three different concentrations of Thiodan[®] lower than the LC₅₀ of 13.67 µg.L⁻¹ previously determined in the laboratory in accordance with the Brazilian Standard Regulation - NBR 15088 (ABNT, 2007). The concentrations used in each experiment were 1.15, 2.3 and 5.6 µg.L⁻¹, and a control group with three repetitions using ten fish in each aquarium. After 96h, six fish from each group were captured and anesthetized with benzocaine (1:10000) according to the norms of the Ethics Committee of the Veterinary Department/UFV (protocol 24/2009). Livers and ovaries were collected and processed by histological techniques. The slides were examined under the light microscope Olympus CX31. Were obtained digital images of 10 random fields per animal at 20X and 40X objective for evaluation. The characteristics of the water used in acute tests were maintained in a stable system in accordance to the recommendations of NBR 15088 (ABNT, 2007). In the experiment 1 (without adaptation/no feeding) at the concentration of 5.6 mg.L⁻¹ of Thiodan[®] (0.10 ± 0.0), the intensity of the PAS reaction was lower in the cytoplasm of hepatocytes when compared to the control group (1.33 ±

0.51). In the same experiment, differences in glycogen depletion were ($P < 0.05$) when compared to the concentrations 1.15 g.L^{-1} (2.66 ± 0.81) and 2.3 g.L^{-1} (3.00 ± 0.0). In addition, changes in the diameter of nuclei and cytoplasm of hepatocytes in all experiments were observed, and an increase in the number of hepatocyte nuclei in groups exposed to Thiodan[®] was associated with a reduction in the amount of cytoplasm. However, the IHA was maintained between 4.33 to 8.33 (control group); 18.50 to 28.83 (1.15 mg.L^{-1} group); 20.33 to 28.33 (2.3 g.L^{-1} group) and 23.66 to 27.66 (5.6 g.L^{-1} group). These results suggest that Thiodan[®] may be influencing liver functions to increase glycogen mobilization according to higher concentrations of exposition. The changes observed in the livers of *A. bimaculatus* were not severe, classified as stage I and II that indicate repairable damage to liver tissue in all experiments. It was observed in the ovaries that the action of Thiodan[®] in sublethal levels did not affect ($P < 0.05$) the morphology of the different stages of follicle development. However, the experiments demonstrated an adaptation response in the number of primary and secondary follicles compared to fish without adaptation. In addition, there was a growing incidence of atretic follicles and increased diameter of the secondary follicles in the groups exposed to Thiodan[®] in all experiments. These results suggest an adaptive response to offset reproductive loss where in unfavorable conditions. The immunohistochemical analysis showed increasing and uniform labeling throughout the follicular development for integrin β_1 and collagen type IV. However, caspase 3 was observed only in the secondary ovarian follicular complex, even when fish were exposed to different concentrations of Thiodan[®], which characterizes the integrity of follicular cells and the apoptotic pathway-dependent caspase-3, which may be activated for future follicular regression.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1. O uso de agrotóxicos

Agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos e industriais, cuja finalidade é preservá-los da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (Lei Federal 7.802 de 11.07.89). Os agrotóxicos são importantes na agricultura; todavia, exigem precaução no seu uso, visando a proteção dos operários que os manipulam e aplicam, dos consumidores, dos animais de criação, de abelhas, peixes, de organismos predadores e parasitas e, enfim, do meio ambiente.

Certas práticas agrícolas ligadas ao modelo de produção agrícola, como o uso excessivo e inadequado de agrotóxicos, a destruição da cobertura vegetal dos solos para plantio, a não preservação das matas ciliares e das vegetações protetoras de nascentes, dentre outros fatores, são responsáveis por grande parte dos problemas com os recursos hídricos (Matuo, 1990).

Os inseticidas constituem importante grupo de praguicidas para o uso agrícola que, ano após ano, mostra um aumento progressivo em seu uso na América do Sul. Estes, nas últimas décadas, começaram a substituir inclusive o trabalho mecânico e manual dos agricultores. Rüegg *et al.* (1987) e Tomita & Beyruth (2002) relatam que o modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se no uso de agrotóxicos. Estes compostos são empregados há muito tempo e, a partir da 2^o guerra mundial, passaram a ser mais intensamente utilizados.

Nos últimos 40 anos, a agricultura brasileira sofreu inúmeras e profundas transformações que alteraram tanto a composição das culturas, como os processos de produção e padrões tecnológicos até então em vigor. Rüegg *et al.* (1987) enfatizam que o processo de modernização, entendido como uma série de transformações tecnológicas nos processos produtivos, intensificou o emprego de insumos, como máquinas, fertilizantes e agrotóxicos, que contam com preços favoráveis e estímulos como crédito farto a juros subsidiados, que facilitaram sua ampla adoção no meio rural. Assim, agrotóxicos têm sido amplamente utilizados como uma das principais ferramentas para um bom programa de controle de plantas daninhas em culturas que têm ganhado espaço na balança comercial agrícola brasileira (Rodrigues & Almeida, 2005). O emprego dos

agrotóxicos tornou-se de uso rotineiro, principalmente pelo menor custo e maior eficiência de controle das plantas daninhas, quando comparados aos demais métodos convencionais de controle. Para Rosa (1998), o modelo baseado no uso intensivo de insumos químicos, de sementes melhoradas e mecanização, foi denominado “Revolução Verde”, que na década de 1980, trouxe ao Brasil um novo alento em relação à produtividade, com grandes esperanças de colheitas fartas e novas tecnologias que propiciaram o domínio de áreas pouco exploradas, como por exemplo, o cerrado da Região Centro-Oeste. De fato, muitas destas expectativas se realizaram; entretanto, o impacto ambiental resultante implicou custos, muitas vezes, irremediáveis, como por exemplo, a perda de biodiversidade e a exaustão de vários cursos d’água por assoreamento, além de contaminação.

1.2. Tipos de inseticidas

Os inseticidas são classificados em quatro categorias conforme sua fórmula química: organoclorados, carbamatos, organofosforados e piretroides. Os organoclorados são produtos sintéticos que possuem carbono, cloro e hidrogênio em sua estrutura química. São persistentes no meio ambiente por vários anos e pouco solúveis em água. Esses inseticidas, quando mal administrados, têm ação tóxica para diversos mamíferos, sendo sua ação não sistêmica, neurotóxica e mutagênica (Guedes, 1990; Pereira et al., 2012). Os carbamatos são inseticidas considerados menos persistentes e com degradação rápida no meio ambiente, não são bioacumulados, pouco lipofílicos, são sistêmicos em plantas, e inibidores da acetilcolinesterase (Guedes, 1990; Ware, 1994; Chatterjee et al., 2001). Os organofosforados são outro grupo de inseticida amplamente utilizado no mercado mundial, representando 35,5% do uso na última década. Esses inseticidas caracterizam-se por pouca solubilidade em água (mais solúveis do que os organoclorados), toxicidade variável em animais vertebrados, em alguns animais e plantas têm atividade sistêmica, baixa persistência no ambiente, e facilmente degradados por enzimas e fatores químicos. A ação desses tóxicos é semelhante ao carbamato, agindo nas vias sinápticas dos axônios, inibindo a acetilcolinesterase (Ware, 1994; Albinati et al., 2009). O piretroide também é um inseticida amplamente utilizado na agricultura, representando 21% do mercado mundial na última década. O fator positivo do uso desse pesticida é que ele é muito tóxico para insetos e apresenta baixa toxicidade para mamíferos, são fotoestáveis, com degradação rápida no solo. A ação tóxica desse inseticida é semelhante aos primeiros inseticidas

desenvolvidos, como o organoclorado DDT, possuindo ação neurotóxica nos axônios (Naumann, 1990; Ware, 1994; Haverinen & Vornanen, 2014).

Nos últimos anos aumentou muito a diversidade de inseticidas, visando a morte de insetos e a persistência do agrotóxico por períodos curtos por questões de segurança ao meio ambiente. Além desses inseticidas que foram mencionados acima, existem vários inseticidas organossintéticos e inseticidas naturais de origem vegetal, animal e microbiana (Casida & Quistad, 1998; Ishaaya & Horowitz, 1998; Drevnick et al., 2006).

1.3. Inseticidas no meio ambiente: rotas de entrada

Os inseticidas podem entrar no meio ambiente acidental ou deliberadamente. A entrada acidental do inseticida origina-se de rejeitos industriais, urbanos, vazamentos durante transporte, armazenamento e distribuição, enquanto a entrada deliberada ocorre pela aplicação de inseticidas no meio rural e urbano. As contaminações por agrotóxicos podem contaminar solos e até mesmo a atmosfera. Nesse último, a movimentação do tóxico se dá por meio de gotas, partículas sólidas e gases que acabam sendo transportados por longas distâncias a partir do local de origem da aplicação (Walker et al., 1996).

O transporte e destino dos agrotóxicos no ambiente aquático é ponto de discussão. Murty (1988) descreveu que os agrotóxicos entram no ambiente aquático por meio da aplicação intencional, implemento aéreo, escoamento das aplicações ou liberação acidental. A descarga dos resíduos da manufatura de agrotóxicos constitui a segunda maior fonte de contaminações dos corpos de água. O efeito mais drástico é esperado no ponto de liberação em lagos e pequenos mares internos. Os efeitos nos oceanos é pequeno devido ao grande volume de água e ação de correntes (Walker et al., 1996).

Na rota de transporte biológico, o sistema não é muito importante em termos de magnitude pela quantidade do xenobiótico acumulado quando comparado com fatores mencionados acima (transporte abiótico), mas é importante para o homem e vida silvestre. O padrão do transporte biológico dos tóxicos acumulados nos organismos segue da seguinte forma: herbívoros, carnívoros e piscívoros (maior eficiência de acúmulo). Nesses últimos, particularmente as espécies de ambientes aquáticos, a acumulação e magnificação são maiores do que nas espécies de ambiente terrestre devido à lipofilicidade dos inseticidas, particularmente os organoclorados. Duas rotas de entrada podem comprometer a toxicidade dos organismos aquáticos: absorção ou

ingestão. A bioconcentração vai ser mais intensa no ambiente aquático, pois a difusão dos poluentes na água aumenta a eficiência de sua absorção pelo organismo aquático devido à lipofilicidade dos organoclorados. Dessa forma, a transferência ao longo de cadeias alimentares é também mais eficiente e a bioconcentração acontece em todas as suas etapas. Devido a isso, os efeitos em predadores podem ser sérios, pois além de grande bioconcentração e transferência pela cadeia alimentar, alguns destes organismos como aves que se alimentam de peixes, e animais marinhos como focas e cetáceos são deficientes no metabolismo de desintoxicação, particularmente devido ao sistema de monoxigenases pouco desenvolvido, comprometendo mais a toxicidade por biomagnificação (Barron, 1995; Borgá et. al., 2004).

Além da bioconcentração, os resíduos destas substâncias presentes nas águas podem ser aderidos ao material orgânico em suspensão, depositar-se no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos. Assim, peixes e invertebrados podem bioacumular tais compostos ligados à matéria ingerida, ser passivamente absorvidos pela superfície corporal ou durante as trocas respiratórias (Vasconcellos & Verani, 2000; Henry & Kishimba, 2006).

1.4. Avaliação de sensibilidade e estudos de toxicidade aquática

A realização de testes de sensibilidade é recomendada como método de qualidade dos planteis de organismos cultivados. Nestes testes, são utilizadas substâncias de referências que incluem, principalmente, os sais dicromato de potássio, cloreto de potássio e cloreto de sódio. Estes dois últimos são mais recomendados, pois seus efluentes experimentais oferecem baixo risco de contaminação ambiental. Os testes de sensibilidade geralmente são de curta duração (24 horas) e devem ser repetidos com frequência, principalmente nos laboratórios que mantêm planteis de organismos-testes, pois estes dados servem como padrão na sensibilidade natural dos organismos. Esta técnica vem sendo utilizada para avaliar os resultados de toxicidade, pois a ação tóxica somente poderá ser atribuída à substância teste quando a sensibilidade natural dos organismos não tiver demonstrado qualquer alteração ao longo do período em que foram testados (Ranzani-Paiva et al., 2004).

O estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre a vida aquática pode ser realizado por meio de ensaios biológicos na natureza ou em condições laboratoriais controladas, sendo este último os mais utilizados por permitirem um controle mais efetivo de fatores ocasionais, como temperatura, pH, duração de exposição, meio, concentração. Ao se

avaliar a toxicidade de agentes tóxicos ou misturas destes frente a um reativo biológico, geralmente se utiliza uma população homogênea, possuindo uma sensibilidade definida, determinando-se a concentração responsável por um efeito tóxico (efeito letal, subletal, crônico, imobilização ou modificação do comportamento, entre outros). Estes testes podem ser realizados utilizando-se sistemas de fluxo contínuo, semi estáticos ou estáticos. Quanto ao meio, pode-se utilizar meio aquático do tipo água continental (água dura, rica em bicarbonatos e sulfatos dissolvidos; ou água mole, isenta de íons cálcio e magnésio), marinha ou salobra, segundo as necessidades dos organismos avaliados (CETESB, 2008). Com relação ao organismo-teste, por razões técnicas e econômicas, é impossível testar todas as espécies que fazem parte do ecossistema aquático. Assim, para esses estudos são relacionados, normalmente, os organismos mais representativos de cada nível trófico na cadeia alimentar, como algas, microcrustáceos e peixes.

1.5. Caracterização do agrotóxico Thiodan[®]

O endosulfan, inseticida desenvolvido pela Hoechst Aktiengesellschaft na Alemanha, foi introduzido no mercado em 1957 com o nome comercial de Thiodan (Goebel et al., 1982 e Stumpf & Abhaver, 1986). O Thiodan[®] é um inseticida acaricida organoclorado, do grupo químico éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico. Esse agrotóxico é classificado toxicologicamente como altamente tóxico (Classe I), classificação ambiental como produto altamente perigoso, além de inflamável e corrosivo (Engelhardt & Sarmiento, 2008).

O ingrediente ativo do Thiodan[®] (350 g/L de endosulfan) consiste na mistura de dois isômeros, sendo 70% de α -endosulfan e 30% de β -endosulfan. Entre os produtos derivados do metabolismo do endosulfan em mamíferos, o sulfato de endosulfan é o principal metabólito devido à sua importância toxicológica (Stumpf & Abhaver, 1986).

Os organoclorados, como o Thiodan[®], atuam nos canais de sódio do axônio, aumentando o período de abertura destes canais. O aumento do período de abertura dos canais de sódio leva a um aumento do fluxo de sódio para o interior da membrana e acarretando um prolongamento da fase de despolarização após o pico do potencial de ação e, devido a isso, o inseto morre por hiperexcitação. Conseqüentemente, a propagação contínua do impulso nervoso gera tremores, convulsões, prostração e, posteriormente, a morte, como observados em insetos. Além disso, pode afetar qualquer tipo de crustáceo, peixes e mamíferos, inclusive em baixas concentrações (Eto, 1990; Pereira et al., 2012).

1.6. O uso do endosulfan

O endosulfan é o único inseticida organoclorado amplamente utilizado em todo o mundo (Capkin et al., 2006; Chakrabarty et al., 2012). Segundo a empresa Bayer (2010), fabricante do produto, o Thiodan[®] (endosulfan) é um inseticida para o controle de insetos chupadores e mastigadores, com ação de contato e ingestão. Recomenda-se seu uso especialmente em cultivos de café, cana, hortaliças, frutas, vinhas e forragens. Adverte, também, que não se devem colher frutos ou vegetais tratados até 21 dias após a última aplicação.

No Brasil, segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a importação do endosulfan está proibida a partir de julho de 2012 e sua utilização a partir de 2013 (Molina, 2010). A utilização de produtos à base de endosulfan no Brasil é estimada em 4,4 milhões de toneladas em uma área de 2,2 a 3,6 milhões de hectares, podendo representar cerca de 40% do consumo mundial deste organoclorado, segundo dados do Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP, 2010). Segundo a Agência de Proteção Ambiental norte americana (EPA, 1980), contaminações humanas por endosulfan são provenientes, em 53% dos casos, da ingestão de água contaminada e, em 47% dos casos, do consumo de alimentos a base de peixes contaminados. A mesma agência define como CL₅₀ aguda, valores de 0,17µg.L⁻¹ para truta arco-íris e 740µg.L⁻¹ para *Daphnia magna*.

A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente, levando em consideração a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA - nº 357/2007, estabelece o valor limite de 0,056 µg/L de resíduo do referido inseticida e seus metabólitos nas águas doces de classe 1.

1.7. Toxicidade aguda do endosulfan

O endosulfan, apesar de pertencer à classe toxicológica I, é altamente tóxico para animais aquáticos e terrestres (espécies não alvo) e, segundo a *Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR* (2000), possui de moderado a alto risco, e efeitos agudos e crônicos.

Pinheiro et al. (1998) advertem com veemência sobre o perigo de contaminação do Pantanal e da Amazônia, lugares ricos em recursos hídricos, por produtos à base de endosulfan, pois este produto é extremamente tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, mesmo em doses muito pequenas. O endosulfan não dissolve facilmente na

água e adere às partículas do solo, levando anos para sua degradação (Soares et al., 2003).

1.8. Efeitos dos inseticidas organoclorados sobre peixes

Apesar dos mecanismos de toxicidade do endosulfan serem extensivamente estudados, alguns trabalhos foram conduzidos com o objetivo de se avaliar efeitos histopatológicos dos agrotóxicos em peixes (Naqvi & Vaishnavi, 1993), especialmente nas gônadas, fígados, brânquias e rins. Em um desses estudos, Capkin et al. (2006) reportaram uma CL_{50} de 19,78 $\mu\text{g/L}$ para *Oreochromis mokyss* para 24 horas de exposição ao tóxico, o que causou além da morte de 50% dos animais, convulsões, nado errático, edema e separação das lâminas branquiais, edema e necrose do fígado, dos túbulos renais e do tecido hematopoiético. Cengiz et al. (2001) reportaram lesões similares em brânquias do peixe-mosquito *Gambusia affinis*, além de congestão e hipertrofia do fígado com o uso do pesticida Thiodan[®]. Segundo Capkin et al. (2006), alcalinidade e temperatura da água, além do tamanho dos peixes, afetam a toxicidade do endosulfan. Assim, peixes pequenos e médios mantidos em temperatura de 13,1°C com 19,78 $\mu\text{g/L}$ do tóxico tiveram uma sobrevivência de 2,5% e 42,5% respectivamente, enquanto os peixes grandes tiveram 100% de sobrevivência. Quando a temperatura da água foi aumentada para 16°C, nenhum dos peixes pequenos e médios sobreviveu, enquanto os sobreviventes de peixes grandes diminuíram para 77,5%. O aumento da alcalinidade de 19,8 mg/L para 41,9 mg/L ou superior, aumentou ($P < 0,001$) a sobrevivência dos peixes. Em relação à dureza, entre 35,7 mg/L e 126 mg/L, a sobrevivência dos peixes expostos ao endosulfan não foi afetada. Histologicamente, as brânquias dos peixes tiveram edema lamelar, separação do epitélio das lamelas, fusão lamelar e hipertrofia das células epiteliais. Os fígados apresentaram edemas e necroses graves.

Cengiz & Ünlü (2002) estudaram os efeitos crônicos do endosulfan sob as brânquias nas concentrações de 0,5 e 0,75 $\mu\text{g/L}$, ao longo de 30 dias de experimento. O que se comprovou é que a dose mais elevada do endosulfan causou mais mudanças patológicas que a menor dose. Altinok & Capkin (2007) não verificaram alteração morfológica nas brânquias de truta com 21 dias de exposição de metiocarb; entretanto, uma concentração superior (3,75 mg/L) causou separação epitelial das brânquias. No mesmo trabalho, os peixes expostos ao endosulfan com concentrações de 0,6 e 1,3 $\mu\text{g/L}$ mostraram mudanças morfológicas nas brânquias, como desprendimento do epitélio,

aparecimento de granulócitos nas lamelas, fusão e necrose lamelar, hipertrofia e núcleos picnóticos. Essas evidências comprovam o efeito do endosulfan com comprometimento das brânquias, levando a redução do consumo de oxigênio e desregulação da função de osmorregulação em organismos aquáticos. Além disso, os efeitos tóxicos do endosulfan no fígado induziram modificações estruturais, como hipertrofia dos hepatócitos, núcleos picnóticos e necroses.

No trabalho de Ballesteros et al. (2007), que utilizaram peixes adultos da espécie *Jenynsia multidentata*, os testes de toxicidade foram realizados durante 96 horas, a fim de determinar a concentração letal (CL₅₀) do endosulfan. As alterações histológicas foram determinadas nas brânquias e nos fígados. A CL₅₀-96 horas foi significativamente diferentes entre machos (0,719 µg/L) e fêmeas (1,317 µg/L). A diferença entre os sexos foi atribuída ao dimorfismo no teor de lipídios no sexo feminino (2,16%) e masculino (1,79%). As alterações histológicas nas brânquias incluíram hipertrofia e levantamento do epitélio das lamelas secundárias e aneurismas. Essas alterações causaram um aumento significativo da espessura da lamela secundária no grupo tratado em relação aos peixes do grupo-controle. Finalmente, as alterações histológicas reversíveis, como degeneração hidrópica e dilatações dos sinusoides, foram observadas nos fígados dos peixes expostos, bem como mudança irreversível, como necrose, nas concentrações mais elevadas. O fígado é um órgão importante na capacidade de degradar compostos tóxicos, mas os seus mecanismos de regulação podem ser comprometidos em concentrações elevadas causando mudanças estruturais como observadas nesses trabalhos.

A qualidade da água é um fator importante para o sucesso da reprodução dos peixes. Quando a qualidade da água é alterada devido a produtos químicos, a estrutura histológica das gônadas também é alterada. Para Cengiz et al. (2001), os efeitos do Thiodan[®] (endosulfan) são tempo e dose dependentes. Dutta et al. (2006) descreveram num estudo de toxicidade crônica, as injúrias causadas pelo Thiodan[®] sobre os túbulos seminíferos do peixe “bluegill” *Lepomis macrochirus*, e relataram alteração dos túbulos seminíferos que mostraram perda dos padrões normais de organização celular, diminuindo também o diâmetro das espermatogônias primárias gradativamente desde as primeiras 24 horas de exposição até as duas semanas seguintes. Segundo os autores, este tipo de dano pode afetar as espermátides e os espermatozoides, apresentando no final, um impacto negativo na espermatogênese e fertilidade do macho, comprometendo o número da população do “bluegill” *Lepomis macrochirus*. Em outro trabalho sobre

reprodução, Hazarika & Das (1998) identificaram mudanças estruturais nos ovários de *Heteropneustes fossilis* exposto ao organoclorado lindano por 72 horas. Os resultados demonstraram que houve ruptura e diminuição do tamanho dos folículos maduros, afetando a fertilidade dos peixes.

1.9. O lambari *Astyanax bimaculatus*

O lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), é conhecido popularmente pelos nomes de lambari, piaba, lambari-guaçu, mojarra, pertence à família Characidae, ordem Characiformes, e até então uma das espécies da subfamília Tetragonopterinae (CEMIG/CETEC, 2000). No entanto, revisões recentes colocam o gênero em “Incertae sedis”, com 88 gêneros e 620 espécies, sendo que 86 espécies pertencem ao gênero *Astyanax* (Lima et al., 2003).

O *A. bimaculatus* é um peixe de pequeno porte, atingindo aproximadamente 20 cm de comprimento e pesando até 40 gramas. Possui corpo irregularmente elíptico, com nadadeiras amarelas, quatro a cinco dentes na série externa e cinco na série interna do pré-maxilar, escamas com reflexos prateados, mancha umeral ovalada, e pedúnculo caudal com mancha alongada que se prolonga até a ponta dos raios caudais medianos (Britiski et al., 1988; CEMIG/CETEC, 2000).

O gênero *Astyanax* possui ampla distribuição geográfica, sendo encontrado desde o sudoeste dos Estados Unidos até a Bacia do rio da Prata (Moreira Filho, 1989, citado por Pereira Filho, 2000). Os lambaris são encontrados em cabeceiras de riachos, rios e lagos, e vivem sempre em cardumes, realizando curtas migrações na época das cheias para sua reprodução. Em relação ao período reprodutivo dos lambaris, este pode variar conforme a espécie e o habitat, sendo normalmente de setembro a março (Vazzoler & Menezes, 1992, citados por Pereira Filho, 2000).

A biologia reprodutiva do lambari pode ser prejudicada pelo desmatamento ciliar, poluição industrial e doméstica, e destruição de várzeas e lagoas marginais por projetos agrícolas que também constituem ameaça em várias regiões (CEMIG/CETEC, 2000). Esses fatores interferem na dinâmica da população desses peixes.

Os lambaris são onívoros, se alimentando de algas, vegetais, sementes, larvas e insetos adultos (CEMIG/CETEC, 2000). Os lambaris são de extrema importância em diversos habitats por equilibrarem o ecossistema e a cadeia alimentar, constituindo fonte de alimentos para peixes maiores, espécies carnívoras e aves. Em estudo conduzido com o lambari da espécie *Astyanax janeiroensis*, verificaram-se que os principais hábitos

alimentares se baseavam em algas, microcrustáceos, pequenos invertebrados e esporos vegetais (Santin et al., 2005). Diversos trabalhos relatam, na literatura, a importância do lambari na estrutura trófica do ecossistema e sua variação alimentar diante de modificações ambientais (Motta & Uieda, 1995; Suarez et al., 1995; Esteves, 1998). Trabalho conduzido por Loureiro et al. (1995) verificando a dieta alimentar na espécie *Hoplias malabaricus* (traíra) no reservatório da UHE de Segredo (PR) mostraram a ingestão alimentar preferencial de lambaris de diversas espécies. Em outro estudo, verificou-se a importância do lambari como alimento para as espécies *Hoplias malabaricus*, *Oligosarcus longirostris* e *Rhamdia branneri* após o represamento do Reservatório de Salto Caxias (PR), demonstrando ser o alimento preferido dessas espécies (Novakoski, 2007). Além disso, na região sudoeste do estado de Minas Gerais existem representantes do gênero no Reservatório de Furnas (MG), caracterizando a reprodução ao longo do ano para o equilíbrio da cadeia alimentar, tendo importância econômica na alimentação e também na prática de pesca profissional (Bazzoli et al., 1998; Carvalho et al., 2009). Portanto, os lambaris são de grande importância em diversos habitats como consumidores secundários (Esteves, 1998). A ecologia alimentar de uma determinada espécie faz parte e interfere diretamente na dinâmica de sua população, sendo primordial para a conservação do ecossistema como um todo (Vitule & Aranha, 2002).

1.10. Morfologia hepática em teleósteos

O fígado é um órgão multifuncional responsável por uma das etapas do processo de desenvolvimento folicular, principalmente no período de formação dos glóbulos de vitelo, momento em que ocorre a transferência de vitelogenina para o ovário, etapa fisiológica que inicia nas células da teca e células foliculares com produção do estradiol. No fígado, o estradiol estimula os hepatócitos a produzirem a vitelogenina e careogenina, que são levadas pela corrente sanguínea até o ovário, onde participam da formação do vitelo e zona radiata durante a maturação folicular (Senthilkumaran et al., 2004). A produção de vitelogenina no fígado pode variar entre as espécies de teleósteos devido às diferenças na capacidade de armazenamento de energia, condição fisiológica, hábitos alimentares e contaminação (Peyon et al., 1996; Hull & Harvey, 2001; Al-Ghais, 2013; Silva Barni et al., 2014). Além disso, o fígado é responsável pela conversão do alimento e desintoxicação de substâncias estranhas (Selman & Wallace, 1989; Ribeiro et al., 2006).

O fígado é glândula digestiva que apresenta superfície coberta por uma membrana serosa, e o tecido conjuntivo de sua cápsula invagina para o parênquima (Takashima & Hibiya, 1995). O fígado de teleósteos é constituído por hepatócitos, células epiteliais dos ductos biliares, células endoteliais, células que armazenam gordura (células de Ito), macrófagos e células sanguíneas circulantes (Hinton et al., 1984) e, em algumas espécies, observam-se células do pâncreas exócrino (pâncreas intra-hepático) distribuídas entre o parênquima do órgão, assim como descrito para o lambari (Santos et al., 2013).

Estruturas lobulares e uma pequena veia central estão presentes em vertebrados; em peixes, estas estruturas variam dependendo da espécie, e são geralmente obscuras (Takashima & Hibiya, 1995). Os hepatócitos arranjam-se em fileiras, os quais geralmente apresentam a espessura de duas células. O hepatócito possui um núcleo único, embora células binucleadas possam ser observadas. O núcleo se localiza na região central ou no pólo celular voltado para o sinusóide, e o nucléolo é bem evidente (Arana, 1995). A circulação no fígado é realizada pela artéria hepática, veia porta, além de capilares sinusóides. Existem cordões de hepatócitos que se arranjam concentricamente ao redor dos capilares sinusóides (Takashima & Hibiya, 1995).

As vias biliares são formadas por canalículos biliares, pré-dúctulo biliar, dúctulo biliar e ducto biliar. O canalículo biliar é formado pela membrana plasmática dos hepatócitos, e os microvilos dos mesmos preenchem o lúmen do canalículo. Nos hepatócitos existem células pré-ductulares que estabelecem complexos juncionais com os hepatócitos, formando os pré-dúctulos biliares. A transição entre pré-dúctulo e dúctulo ocorre quando o lume biliar está completamente circundado por células epiteliais biliares. O ducto biliar é formado por células epiteliais cúbicas nos ductos de menor calibre e células colunares nos grandes ductos, sendo a presença de lâmina basal o fator diferenciador dos mesmos. Nos grandes ductos, circundando a lâmina basal, estão fibroblastos, plexo capilar, fibras nervosas e células musculares lisas. Acredita-se que estas células musculares promovam os movimentos peristálticos, impulsionando a bile. Esse ducto une-se ao ducto cístico, dando origem ao ducto colédoco (Arana, 1995).

O endotélio é fenestrado, e a lâmina basal está ausente. No espaço de Disse há células de Ito, que em teleósteos, se caracterizam por apresentar vesículas lipídicas, assim como o mesmo tipo celular em mamíferos (Arana, 1995). Há algumas mudanças patológicas que podem ocorrer no fígado de peixes que sofreram exposição a tóxicos ou outras substâncias irritantes dissolvidas na água. A atrofia é caracterizada por

diminuição do tamanho dos hepatócitos, com presença de núcleos picnóticos. Também podem ocorrer necrose, degeneração vacuolar, degeneração gordurosa, estagnação da bile, inflamação do parênquima hepático (hepatites), cirrose hepática e desenvolvimentos de tumores (Takashima & Hibiya, 1995).

1.11. Morfologia ovariana em teleósteos

Os ovários das fêmeas *A. bimaculatus* seguem os padrões descritos para a maioria dos teleósteos, sendo órgãos pares, alongados e foliáceos, sofrendo modificações na espessura, volume e coloração durante as diferentes fases do ciclo reprodutivo, conforme observado também em outras espécies do gênero (Drummond, 1996; Miranda, 1996; Melo et al., 2005; Mazzoni et al., 2005; Rodrigues & Almeida, 2005; Carvalho et al., 2009; Prado et al., 2011). Nesses peixes, o ovário é do tipo cistovariano, onde o lume ovariano se estende até o oviduto, como na maioria dos peixes teleósteos (Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1986; Connaughton & Aida, 1998).

Nas observações histológicas do ovário de *A. bimaculatus*, verificou-se que os mesmos são envolvidos externamente por uma serosa peritoneal, constituída por mesotélio e lâmina do tecido conjuntivo fibroso. Profundamente a essa estrutura, observa-se túnica albugínea de natureza conjuntiva, contendo fibrócitos e vasos sanguíneos. A túnica albugínea emite septos para o interior do órgão, formando lamelas ovulíferas, nas quais encontram-se ovogônias e folículos em diferentes fases de desenvolvimento. No lambari, o tipo de desenvolvimento folicular é assincrônico, com a presença de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento (Miranda, 1996; Drummond, 1996; Marcon, 2008).

Em peixes, o desenvolvimento folicular tem sido descrito por vários pesquisadores (Begovac & Wallace, 1988; Bazzoli & Rizzo, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Grier, 2000 e 2002; Carvalho et al., 2009) e, como nos animais em geral, compreende os períodos pré-meiótico, perinucleolar, pré-vitelogênico, vitelogênico e maturação final. Os folículos passam por diversas fases de desenvolvimento, diferenciação e maturação, de acordo com o período reprodutivo do animal (Wallace & Selman, 1981). Essas fases ocorrem no interior de folículos cuja parede, constituída de zona radiata, camada folicular, membrana basal e teca (Grier, 2000) desempenham um importante papel durante a ovogênese e na fertilização.

A foliculogênese é regulada hormonalmente pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Em peixes teleósteos, estímulos ambientais são convertidos em informações sensoriais no cérebro, associados com a liberação de hormônios liberadores de gonadotropinas (GnRH) pelo hipotálamo que, via corrente sanguínea, chegam à adenohipófise, que sintetiza e libera hormônios gonodotrópicos: hormônio foliculo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). Os hormônios FSH e LH se ligam aos receptores celulares das células tecais (LH-R) e foliculares (LH-R e FSH-R) para estimularem a produção 17 α -hydroxy-pregesterona (17 α -HP) e testosterona (T). Nas células foliculares, os hormônios esteroides 17 α -HP e T agem como precursor na produção do 17 β -estradiol (17 β -E) e do hormônio indutor de maturação (MIH), substâncias importantes nas etapas do desenvolvimento folicular e na ovulação, respectivamente (Dietrich & Krieger, 2009) (Figura 1).

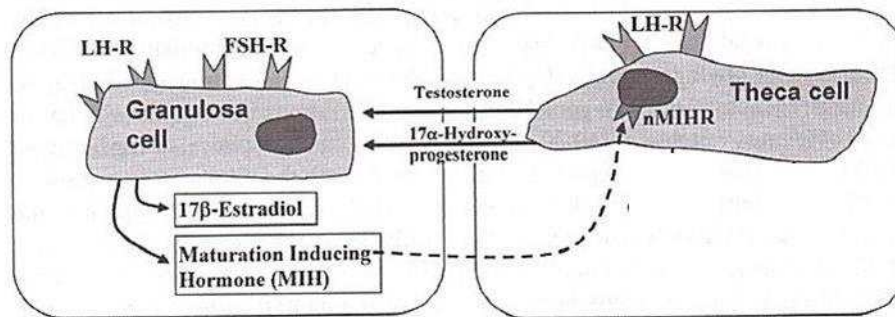


Figura 1. Células somáticas do ovário e principais produtos (Adaptado de Dietrich & Krieger, 2009).

Muitas das espécies nativas não desovam espontaneamente em ambientes lênticos. Algumas espécies nativas quando mantidas em cativeiro se preparam para a reprodução, mas não desovam naturalmente, e sofrem regressão ovariana, com conseqüente atresia dos folículos. A atresia folicular é um processo degenerativo de ocorrência comum nos ovários de vertebrados e os folículos podem sofrer atresia em diferentes fases do desenvolvimento ou diferenciação (Guraya, 1986; Miranda et al., 1999; Santos et al., 2008b).

A ovulação refere-se à expulsão do folículo em desenvolvimento maduro (Redding & Patiño, 1993). Na natureza, a ovulação é regulada por dois hormônios, os quais estimulam o desenvolvimento gonadal em peixes: FSH e LH (Connaughton & Aida, 1998; Klausen et al., 2001). Estes hormônios gonadotrópicos agem nos órgãos reprodutores, promovendo o desenvolvimento e maturação das células germinativas. O

processo de transporte dos hormônios para as células reprodutoras é lento em ambientes naturais; mas, na reprodução artificial, com a técnica de hipofiseção, esse processo torna-se mais rápido em relação ao processo natural (Woynarovich & Horvath, 1980).

Nos ovários de peixes teleósteos com fertilização externa, os folículos pós-ovulatórios, estruturas remanescentes da desova, são frequentes. Um aspecto interessante é saber a duração da reabsorção dos folículos pós-ovulatórios nos procedimentos de desova induzida para as espécies em criação. Drummond (1996) e Marcon (2008) estudaram a reabsorção dos folículos pós-ovulatórios no estroma ovariano em maturação avançada de lambaris (*A. bimaculatus lacustris*), e observaram que cinco dias após a desova os folículos haviam sido reabsorvidos. Durante esse processo, figuras de apoptose são observadas em fêmeas submetidas à hipofiseção (Drummond et al., 2000), o mesmo ocorrendo em *Leporinus taeniatus* (Anostomidae) (Santos et al., 2003). Santos et. al. (2008a) registraram por meio das técnicas de TUNEL e de imunistoquímica, o índice apoptótico em células foliculares dos folículos pós-ovulatórios em *Prochilodus argenteus*, notando que o maior índice de células foliculares apoptóticas coincidiu com menores valores de integrinas e colágeno tipo IV, no terceiro dia após a desova induzida. Esses achados demonstram a importância dessas proteínas na integridade das células foliculares nos folículos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos do inseticida organoclorado endossulfan em sua apresentação comercial Thiodan[®], sobre as características morfológicas dos ovários e fígado de fêmeas adultas de lambaris *A. bimaculatus* após exposição subletal a esse agrotóxico durante a maturação avançada.

2.2. Objetivos específicos

- Estimar a CL₅₀ para fêmeas adultas de *A. bimaculatus* em maturação avançada expostas ao inseticida organoclorado Thiodan[®];
- Avaliar, histopatologicamente, o fígado dos animais dos grupos controles e tratados;
- Analisar por morfometria os principais constituintes celulares do fígado nos grupos controles e tratados;
- Avaliar diferenças nos valores dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) de animais dos grupos controles e expostos ao tóxico;
- Verificar prováveis alterações morfológicas nos diferentes estádios de desenvolvimento de folículos ovarianos nos grupos submetidos aos efeitos do tóxico, utilizando-se microscopia de luz;
- Quantificar os diferentes tipos de folículos, e avaliar por morfometria, os diâmetros dos folículos vitelogênicos nos grupos controles e tratados;
- Avaliar e quantificar o processo de atresia folicular nos grupos controles, comparando-os com os grupos tratados;
- Analisar qualitativamente, por imunistoquímica, as proteínas de adesão celular (integrina $\beta 1$ e colágeno do tipo IV) nas células foliculares ao longo do desenvolvimento folicular nos peixes dos grupos controles e tratados; e

- Analisar qualitativamente, por imunohistoquímica, a proteína caspase 3 nas células foliculares ao longo do desenvolvimento folicular nos peixes dos grupos controles e tratados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária, onde foram realizados o teste de toxicidade aguda e o teste subletal quanto as atividades de coleta, fixação e inclusão dos fragmentos dos fígados. As etapas de microtomia, coloração de lâminas histológicas e as análises histológicas e morfométricas foram realizadas nos Laboratórios de Peixes e de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV (DVT/UFV).

3.1. Animais

Foram utilizadas fêmeas do lambari *A. bimaculatus* mantidas em tanques de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG. Para o presente estudo, foram selecionadas fêmeas em maturação avançada, com peso (g) de $11,52 \pm 2,01$ e comprimento total (cm) de $9,12 \pm 0,64$. As características para a escolha dos animais se basearam em aspectos corporais como ventre abaulado, poro genital dilatado e vascularizado.

Os peixes foram transportados para o Biotério de Peixes do DVT/UFV. Os aquários onde os animais foram mantidos possuem capacidade de 50 litros numa densidade de 0,5g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, temperatura controlada e monitoramento duas vezes ao dia. Todos os aquários possuíam um sistema de filtração (250L/h) e aeração contínua de água para garantir o bem-estar dos peixes (Figura 2). Os peixes foram alimentados com ração comercial Purina contendo 35% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo da piscicultura. As características da água utilizada no teste em sistema estático foram mantidas de acordo com as recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2007) com temperaturas de $25,5 \pm 1,0$ °C, livre de cloro, pH $7,2 \pm 0,3$; oxigênio dissolvido $6,9 \pm 0,6$ mg/L⁻¹ e dureza total $28,15 \pm 5,94$ mg/L⁻¹ (CaCO₃).

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (protocolo 24/2009). O médico veterinário responsável foi o Doutor Laércio dos Anjos Benjamin (CRMV-MG 3387).

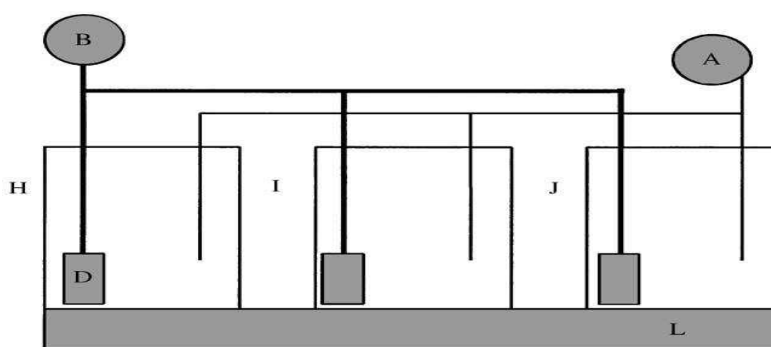


Figura 2. Principais componentes estruturais dos grupos experimentais (Adaptado de Oliveira Ribeiro et al. 2002).

A: Bomba para oxigenação da água. B: Termostato para controle da temperatura. D: Filtro interno. L: Material contra isolamento de ruído. H-J: Três aquários para cada grupo experimental (Controle e e cada uma das concentrações de Thiodan[®]).

Os lotes de peixes (120 peixes em cada lote) foram destinados à ação do tóxico em quatro tratamentos diferentes:

Experimentos	Tratamentos
Experimento 1	sem aclimatação e sem alimentação
Experimento 2	sem aclimatação e com alimentação
Experimento 3	com aclimatação e sem alimentação
Experimento 4	com aclimatação e com alimentação

O período de 10 dias para aclimatação dos peixes foi para permitir que as características ovarianas sejam comparadas com os grupos que não foram aclimatados. Dessa forma, mostrará quais as melhores condições que esses peixes podem ter na reprodução quando expostos às diferentes concentrações do tóxico.

3.2. Agrotóxico

Para a avaliação proposta no presente experimento, foi utilizado o inseticida organoclorado Thiodan[®] (Bayer) em sua apresentação com 350g/L de endosulfan.

3.3. Teste de toxicidade aguda em sistema estático – CL₅₀

A definição das concentrações tóxicas a serem testadas nem sempre ocorre de maneira simples. Muitas vezes, faz-se necessário uma análise preliminar para a definição da melhor faixa de concentração a ser considerada nos testes definitivos. Dessa forma, a primeira providência desse estudo de toxicidade aguda é a realização de testes preliminares que devem ser conduzidos com concentrações tóxicas relacionadas entre si por progressões geométricas de razão 10, calculadas com base em informações

obtidas por meio de testes já realizados com outros organismos que mais se assemelham filogeneticamente ao grupo em questão (Ranzani-Paiva, 2004). A partir dos resultados obtidos nessa fase, é possível estabelecer a faixa ideal de concentração para condução dos testes definitivos com o lambari.

O teste de concentração letal (CL_{50}), que avalia a concentração responsável pela mortalidade de metade dos animais, foi realizado em sistema de água estático de acordo NBR 15088 (ABNT, 2007), com os animais mantidos sob restrição alimentar que se iniciou 24 horas antes do início e perdurou durante o teste. Essa restrição alimentar foi realizada para evitar acúmulo de matéria orgânica que poderia interferir na ação do agrotóxico.

Para o teste foram selecionados 120 lambaris, fêmeas, adultas, em maturação avançada, com aproximadamente 7cm de comprimento. O agrotóxico utilizado foi o Thiodan[®] (Bayer), com 350g/L^{-1} de endosulfan. Foram utilizadas três repetições com cinco peixes cada, para cada concentração de Thiodan[®] adotada, sendo os grupos assim classificados: controle ($0\mu\text{g/L}^{-1}$), $1,5\mu\text{g/L}^{-1}$, $3,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $6,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $12,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $24,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $48,0\mu\text{g/L}^{-1}$ e $96,0\mu\text{g/L}^{-1}$. As concentrações foram distribuídas em recipientes plásticos com 1,5L de água dos próprios aquários (Figura 3). Para obter as diferentes concentrações, o Thiodan[®] foi diluído uma primeira vez 1:100 (Solução Padrão Intermediária, contendo 3.500mg/L^{-1} de endosulfan) e uma segunda vez 1:100 (Solução Padrão Final, contendo $35.000\mu\text{g/L}^{-1}$ de endosulfan), viabilizando a observação da toxicidade total do agrotóxico, e não apenas do princípio ativo (Figura 4).



Figura 3. Recipiente utilizado e distribuição das concentrações.



Figura 4. Preparação da solução padrão final do Thiodan[®].

Foram feitas as verificações de mortalidade a cada seis horas (zero, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90 e 96 horas), removendo-se os animais mortos, o que proporcionou menores interferências pela decomposição dos peixes, gerando maior confiança da mortalidade apresentada ser em função da toxicidade do princípio ativo endossulfan sinergicamente à ação dos solventes e demais compostos do inseticida. Para acompanhamento da temperatura, foi adicionado 1,5L de água do mesmo aquário, em um recipiente idêntico, de forma que qualquer variação na temperatura pudesse ser medida sem provocar estresse adicional a nenhum grupo. O teste teve início no dia 16/01/2010 às 10:00 horas, com término às 10:00 horas do dia 20/01/2010. O programa utilizado para o cálculo da CL_{50} foi o TOXCALC, determinando o valor e o intervalo de confiança pelo método PROBITUS ($P < 0,05$).

3.4. Teste de toxicidade subletal em sistema estático

Depois de estimar a CL_{50} pelos testes preliminares, foi realizada aclimação de novos lambaris como descrito no item 3.1. (Figura 2), onde os peixes se acostumaram ao seu novo meio e às atividades normais de manutenção, como alimentação e limpeza dos aquários. O teste de toxicidade aguda com o endossulfan foi realizado baseando-se principalmente nas normas técnicas para teste em sistema estático de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007).

O teste de toxicidade subletal foi feito com três diferentes dosagens do tóxico, inferiores à CL_{50} e, para fins estatísticos, cada concentração, incluindo-se o grupo controle, teve três repetições sob as mesmas condições, para depois se avaliar e

quantificar a mortalidade se for o caso, observar o comportamento dos animais que sobreviveram à intoxicação e os efeitos morfológicos nos fígados e ovários dos peixes expostos. Assim, como foram três repetições usando-se três diferentes concentrações do tóxico e um grupo controle, para a realização do presente experimento foram necessárias 120 fêmeas de lambari para cada experimento (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição das fêmeas de lambaris *Astyanax bimaculatus* em cada grupo experimental.

Repetição	Controle	1,15µg/l	2,3µg/l	5,6µg/l
A	10	10	10	10
B	10	10	10	10
C	10	10	10	10

Para cada peixe que sobreviveu à intoxicação pelo período de 96 horas (teste de toxicidade subletal) foram obtidos dados biométricos como peso corporal, comprimento total e comprimento-padrão, peso do fígado e peso do ovário. Os ovários e fígados, na sequência, foram fixados para posterior análise histológica.

3.5. Avaliação morfológica

3.5.1. Microscopia de luz

Após 96 horas de experimento, seis animais de cada grupo foram coletados, anestesiados com benzocaína e eutanasiados para coleta dos ovários e fígados. Para o estudo das características morfológicas de ovários e fígados, os fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2. O material foi fixado por um período mínimo de 24 horas e preservado em álcool 70%. Em seguida, os fragmentos foram transferidos para solução de álcool 95% por quatro horas. Após isso, os fragmentos de ovários e fígados foram imersos em solução de álcool 95% e resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin) na proporção de 1:1 por 12 horas, seguida de resina pura por 24 horas, e posterior emblocamento. Os fragmentos foram seccionados em cortes com 3µm de espessura em micrótomo rotativo com navalha de vidro. Foi preparada uma lâmina por animal com quatro cortes em cada e em padrão semi-seriado, ou seja, a cada corte aproveitado eram descartados cinco cortes seguintes para evitar que a mesma célula fosse contada duas vezes no momento da análise, baseando-se no diâmetro nuclear previamente estabelecido para cada tipo celular em questão.

As colorações utilizadas foram azul de toluidina e hematoxilina/eosina, para análises histológicas e para morfometria. Também foi utilizada a reação histoquímica com PAS contracolorados com hematoxilina para os cortes de fígados. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck®), analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus, e as imagens foram obtidas com câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus.

3.5.2. Análises morfológicas e morfométricas dos fígados

Os estudos morfológicos foram conduzidos em seis animais por concentração. As lâminas histológicas foram analisadas em toda sua extensão e fotografadas (ocular de 10X e objetiva de 40X) em 10 campos ao acaso para análises morfológicas e morfométricas que pudessem ser representativas dos efeitos do Thiodan® no tecido hepático. Estas alterações foram comparadas com o padrão de organização dos fígados das lâminas do grupo controle.

As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente em duas formas: 1) por meio do cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões. Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada animal conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontualmente localizadas) e grau 3 (lesões amplamente distribuídas pelo órgão) em 10 campos fotografados; e 2) por meio do cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), com base na severidade de cada lesão de acordo, com Schwaiger et al. (1997). Para tanto, as alterações foram classificadas em estádios progressivos quanto ao comprometimento das funções do órgão: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis, adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994) (Tabela 2). O valor de IAH foi calculado para cada animal utilizando a fórmula: $IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$, sendo I, II e III correspondentes ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. O valor médio de IAH foi dividido em cinco categorias, seguindo metodologia de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994): 0-10= funcionamento normal do tecido; 11-20= dano leve a moderado do tecido; 21-50= dano moderado a severo do tecido; 51-100= dano severo do tecido; maior que 100= dano irreparável do tecido. Este índice permitiu a comparação da severidade das lesões hepáticas entre os peixes expostos às diferentes concentrações do tóxico.

Tabela 2. Classificação das alterações histológicas do fígado quanto ao estágio de comprometimento das funções teciduais (adaptado de Poleksic & Mitrovic–Tutundzic,1994).

ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS HEPÁTICAS	ESTÁGIO
1. Alteração nos hepatócitos	
Atrofia nuclear	I
Atrofia nuclear	I
Deformação do contorno celular	I
Deformação do contorno nuclear	I
Hipertrofia celular	I
Hipertrofia nuclear	I
Núcleo na periferia da célula	II
Vacuolização citoplasmática	II
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Núcleos picnóticos	II
Rompimento celular	II
2. Alterações nos vasos sanguíneos	
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
3. Necrose	
Necrose focal	III

Para as análises morfométricas foram realizadas dez medições dos diâmetros de núcleos e citoplasmas de hepatócitos para cada animal. As medidas foram obtidas por meio do programa Image-Pro Plus, traçando duas linhas perpendiculares, respeitando-se os limites do núcleo e do citoplasma do hepatócito em análise (Figura 5). Além disso, foram quantificados pontos de interseção sobre núcleo, citoplasma, capilar sinusoides e macrófagos em 10 campos (gradícula com 100µm de lado e uma área de 10000µm²), totalizando 4410 pontos/animal para o cálculo da constituição tecidual hepática (Figura 6). Estas avaliações foram conduzidas nos grupos controles e grupos de peixes expostos ao tóxico nas diferentes concentrações.

A quantidade de glicogênio nos hepatócitos foi avaliada em toda extensão da lâmina de forma semiquantitativa, sendo evidenciada pela reação histoquímica de Periodic Acid Schiff (PAS), segundo Michalany (1980). Para melhor compreensão dos resultados, as marcações foram determinadas na seguinte escala: 0- ausência de glicogênio, 1- pouco glicogênio, 2- quantidade moderada de glicogênio, 3- muito glicogênio. Após esta análise, foi calculada uma média do conteúdo de glicogênio dos hepatócitos nos grupos controles e grupos expostos ao tóxico nas diferentes concentrações.

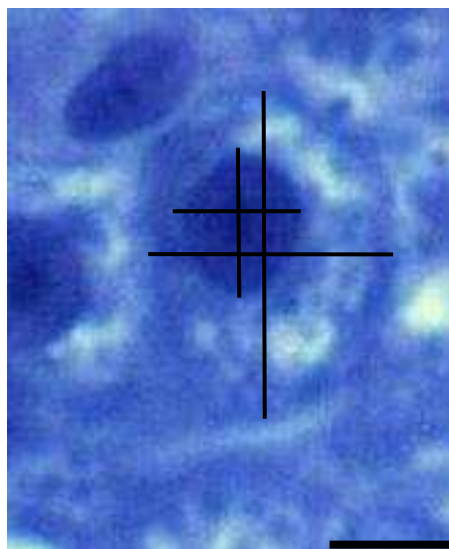


Figura 5. Metodologia para obtenção de medidas de diâmetro de núcleo e citoplasma de hepatócitos por meio do programa Image-Pro Plus. **Coloração:** Azul de toluidina. **Barra:** 5 μ m

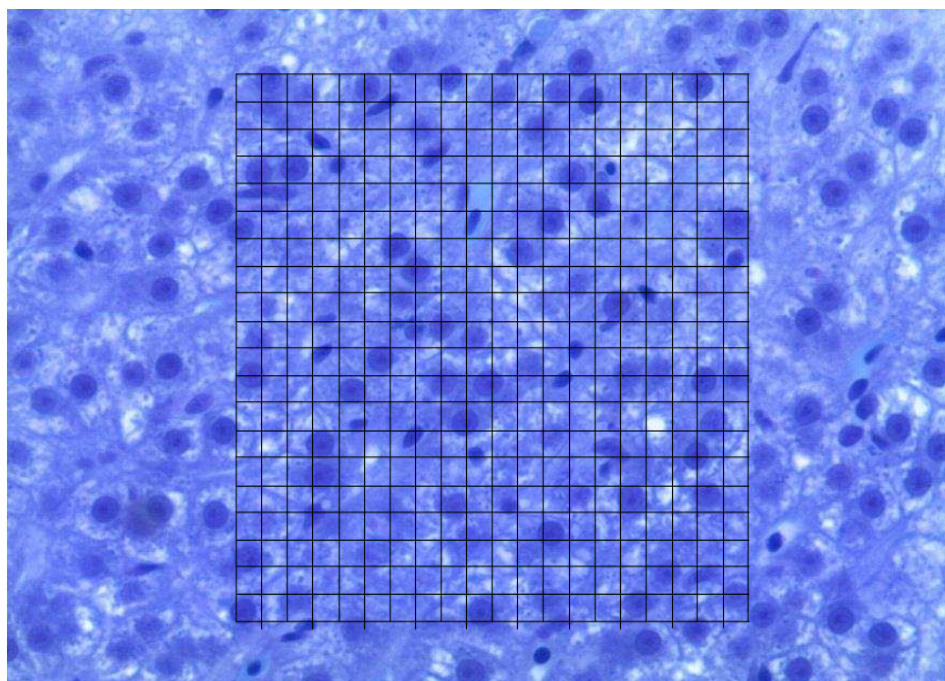


Figura 6. Gradícula utilizada para contagem de pontos de interseção sobre núcleos e citoplasmas de hepatócitos, capilares e macrófagos (4410 pontos/animal). **Coloração:** Azul de toluidina.

3.5.3. Análises morfométricas e morfológicas dos ovários

Os estudos foram conduzidos em seis animais de cada grupo em cada experimento. As lâminas histológicas foram analisadas em toda sua extensão em busca de alterações morfológicas foliculares (Tabela 3) que pudessem ser representativas dos efeitos do Thiodan[®] no tecido ovariano, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos ovários das lâminas dos grupos controles.

Para a avaliação morfométrica foram realizadas contagens dos diferentes estágios de desenvolvimento folicular. Para isto, foram utilizadas fotografias obtidas a partir de 10 campos escolhidos ao acaso em objetiva de 10X (campo com 509,4µm de largura por 681,20µm de comprimento, totalizando uma área de 18,63 mm²). Além disso, foi realizada a contagem de folículos atresícos e observados eosinófilos associados aos folículos vitelogênicos, utilizando o microscópio com objetiva de 40X, avaliando-se 10 folículos escolhidos ao acaso para cada animal nos quatro experimentos. Também foram realizadas medições de diâmetros em 10 folículos vitelogênicos para cada animal. Estas medidas foram obtidas pelo programa Image-Pro Plus traçando-se duas linhas perpendiculares sobre núcleo e central, e respeitando-se os limites do folículo. As mensurações foram realizadas em imagens obtidas com objetiva de 4X (Figura 7). Em todas as contagens e medições foram calculados os valores médios e desvios-padrão para cada concentração para se avaliar o desenvolvimento folicular nos diferentes experimentos.

Tabela 3. Alterações histológicas do ovário quanto ao comprometimento folicular (adaptado de Chatterjee et al., 1997; Dutta & Dalal, 2008).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS FOLICULARES

Alteração nos folículos

Descolamento do revestimento folicular

Retração citoplasmática

Retração nuclear

Atresia folicular

Aglutinação nucleoplasmática

Aglutinação citoplasmática

Aglutinação dos glóbulos de vitelo

Folículos vazios

Granulócitos envolvendo folículos

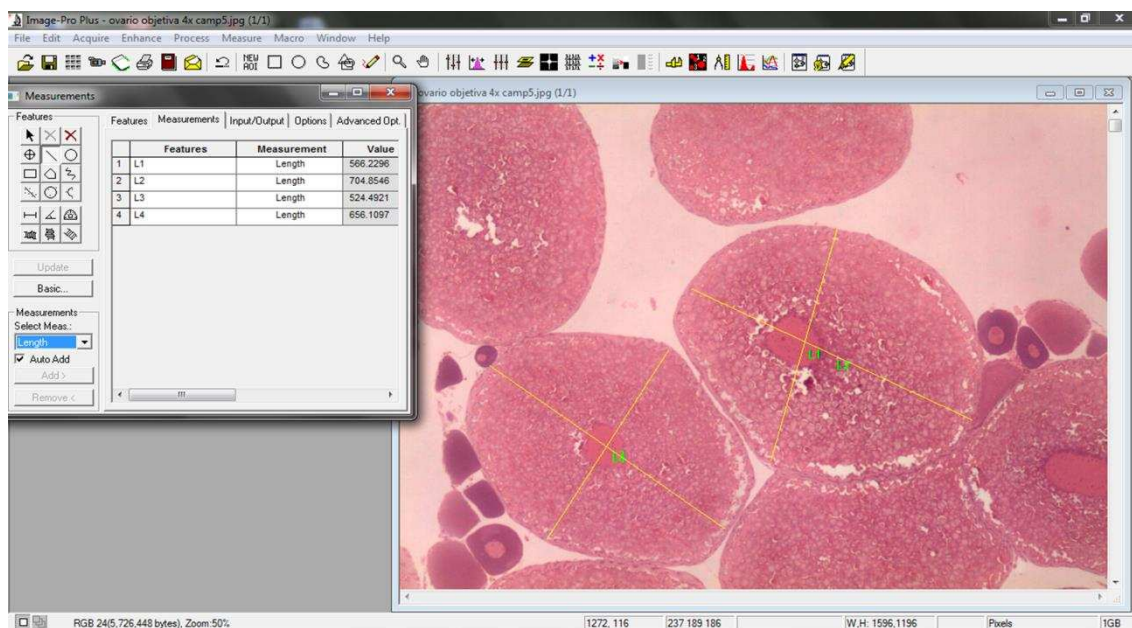


Figura 7. Metodologia para obtenção de medidas de diâmetro de ovócitos vitelogênicos avançados por meio do programa Image-Pro Plus. **Coloração:** Hematoxilina eosina.

3.5.4. Imunoistoquímica

Para detectar a possível imunorreatividade para colágeno tipo IV, integrinas β_1 e caspase 3 no tecido conjuntivo, ovários do lambari foram fixados em paraformaldeído a 4%. A recuperação antigênica, foi realizada em forno microndas por 10 minutos com os cortes nas lâminas sendo imersos em tampão citrato 10mM pH 6,0. As lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% em tampão fosfato por 15 minutos, em temperatura ambiente, para inativar peroxidase endógena, e com soro albumina bovina a 2% por 45 minutos, para bloquear marcador antigênico inespecífico. Anticorpos primários anti-colágeno tipo IV, anti-integrina β_1 e anti-caspase 3 (Santa Cruz Biotechnology, Calif., USA) foram aplicados nas secções a 4°C na diluição 1:100 (integrina e colágeno tipo IV) e 1:200 (Caspase 3) segundo o fabricante, “overnight”. Os cortes foram lavados em PBS e incubados por 45 minutos com diluição de 1:200 com anticorpo secundário IgG anti-coelho (LSAB 2 sistema HRP da Dako Cytomation kit; Dako Cytomation, Carpinteria, Calif., USA), e tratado com peroxidase conjugada com estreptavidina por 45 minutos. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina (Santos et. al., 2008a).

3.6. Parâmetros biométricos

Para analisar quantitativamente a atividade reprodutiva do *A. bimaculatus*, foram registrados, para cada exemplar, os seguintes dados biométricos: peso corporal (em g), peso dos ovários (em g) e peso do fígado (em g). Os valores médios e desvios-padrão dos índices gonadossomático e hepatossomático foram calculados para cada animal, em cada um dos grupos propostos no presente estudo.

a) Índice gonadossomático (IGS)

$$\text{IGS} = \frac{\text{PG}}{\text{PC}} \times 100$$

PG= peso dos ovários
PC= peso corporal

b) Índice hepatossomático (IHS)

$$\text{IHS} = \frac{\text{PF}}{\text{PC}} \times 100$$

PF= peso do fígado
PC= peso corporal

3.7. Análises estatísticas

As variáveis quantitativas foram submetidas aos testes de homocedasticidade (Levenes) e normalidade (Shapiro-Wilk) e, posteriormente à análise de variância, para testar as variações nos valores médios dos índices calculados no momento da coleta (96 horas) entre os grupos controles e os grupos tratados. Foi analisado o coeficiente de variação para se evitar erros estatísticos tipo I e tipo II e, logo após, foi realizado o teste paramétrico de Duncan ou Tukey ($P < 0,05$) para comparar os valores médios. Quando não atenderam às premissas de normalidade e homocedasticidade, mesmo após as transformações apropriadas, os dados foram submetidos aos testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis (ANOVA). Para as variáveis qualitativas quantificadas foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA). Os gráficos foram produzidos usando o software Microsoft Excel 2010.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT-NBR15088. ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA- TOXICIDADE AGUDA- MÉTODO DE ENSAIO COM PEIXES. NBR 15088: 2007.
- ALBINATI, A.C.L.; MOREIRA, E.L.T.; ALBINATI, R.C.B.; CARVALHO, J.V.; LIRA, A.D.; SANTOS, G.B.; VIDAL, L.V.O. Biomarcadores histológicos: toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 6(3):621-627, 2009.
- AL-GHAIS, S. M. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Marine Pollution Bulletin**, 74:183-186, 2013.
- ALTINOK, I.; CAPKIN, E. Histopathology of Rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan. **Toxicologic Pathology**, 35:405-410, 2007.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological profile for endosulfan**. 2000. Disponível em: www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles. Acesso em: 20/08/2011.
- ARANA, S. **Estrutura histológica do fígado de peixes**. In: II Semana sobre histologia de peixes, Jaboticabal/SP. 39-49, 1995.
- BALLESTEROS, M. L.; BIANCHI, G. E.; CARRANZA, M.; BISTONI, M. A. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health**, 42(4):351-357, 2007.
- BARRON, M. G. Biocummulation and bioconcentration in aquatic organisms. In D. J. Hoffman et al. (Eds.) **Handbook of ecotoxicology**, Boca Raton: Lewis. 652-666. 1995.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 4:399-410, 1990.
- BAZZOLI, N.; MESQUITA, T.L.; SANTOS, G.B.; RIZZO, E. Análise comparativa da reprodução de *Astyanax bimaculatus* (Pisces, Characidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. **Bios**, 6(6):99-112, 1998.
- BAYER. Disponível em: http://www.bayercropscience.com.br/protecaodecultivos_ebiotecnologia/ DetalheDoProduto.fss?Produto=52. Acesso em: 10/10/ 2010.
- BEGOVAC, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **Journal of Morphology**, 197: 353-369, 1988.
- BORGÁ., K. FISK, A. T., HOEKSTRA, P. F. & MUIR, D. C. G. Biological and chemical factors of importance in the biocummulation and trophic transfer of persistent organochlorine contaminants in Arctic marine food webs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23:2367-2385, 2004.
- BRITISKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. **Manual de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações - CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 143 p., 1988.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, 64:1793-1800, 2006.
- CARVALHO, P. A.; PASCHOALINI, A. L.; SANTOS, G. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N. Reproductive biology of *Astyanax fasciatus* (Pisces: Characiformes) in a reservoir in southeastern Brazil. **Journal of Applied Ichthyology**, 25(3):306-313, 2009.

- CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, 43:1-16, 1998.
- CEMIG/CETEC - COMPANHIA ENERGETICA DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrativo de peixes do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, 2000. 144p.: il, mapa.
- CENGIZ, E. I.; ÜNLÜ, E.; Histopathological changes in the Gills of mosquitofish, *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 68:290-296, 2002.
- CENGIZ, E. I.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of Thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health**, 36:75-85, 2001.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ECO_HELP.htm-30k Help - Informações Ecotoxicológicas. Acesso em: 10/102008.
- CHAKRABARTY, S.; RAJAKUMAR, A.; RAGHUVeer, K.; SRIDEVI, P.; MOHANACHARY, A.; PRATHIBHA, Y.; BASHYAM, L.; DUTTA-GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 155(3):491-497, 2012.
- CHATTERJEE, S.; DUTTA, A. B.; GHOSH, R. Impact of carbofuran in the oocyte maturation of catfish, *Heteropneustes* (Bloch). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 32:426-430, 1997.
- CHATTERJEE, S.; DASMAHAPATRAA, A. K.; GHOSHA, R. Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 129:265-273, 2001.
- CONAMA. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2007**. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em 12/07/2010.
- CONNAUGHTON, M. A.; AIDA, K. Female reproductive system, in fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopaedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. 193-205, 1998.
- DIETRICH, D. R.; KRIEGER, H. O. Histological analysis of endocrine-disruptive effects in small laboratory fish. **Chapter 4: Female gonad anatomy and morphology**, 66-87, 2009.
- DREVNICK, P. E.; SANDHEINRICH, M. B; ORIS, J. T. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. 79(1):49-54, 2006.
- DRUMMOND, C. D. **Folículo pós-ovulatório de lambari *Astyanax bimaculatus lacustris* (Pisces, Characidae) submetido a desova induzida: estudo histológico e ultra-estrutural**. UFMG, Belo Horizonte, 1996. 123 p. (Dissertação, Mestrado).
- DRUMMOND, C. D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, 287:176-182, 2000.
- DUTTA, H. M.; DALAL, R. The Effect of Endosulfan on the Ovary of Bluegill Sunfish: A Histopathological Study (*Lepomis macrochirus*). **International Journal of Environmental Research**, 2(3): 215-224, 2008.
- DUTTA, H. M.; MISQUITA D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 521:149-56, 2006.

- ENGELHARDT, G. T.; SARMENTO, R. **Comportamento ambiental do thiodan CE (endosulfan) usado no controle químico da broca do fruto do cafeeiro.** (Dissertação, Mestrado), Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo Disponível em: http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2004/marco/23/noticiario/meio_ambiente/arquivo.doc. Acessado em: maio 2008.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia.** 2ª Ed. Edição - Rio de Janeiro, 1998.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1980. Toxicology network. Endosulfan factsheet. EPA-440/5-80-046. <http://toxnet.nlm.nih.gov>> Acesso em janeiro de 2010.
- ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Chemistry of Plant Protection**, Berlin, Spring-Verlag, 6:67-68, 1990.
- GOEBEL, H.; GORBACH, S.; KNAUF, W.; RIMPAU, R. H.; HÜTTENBACH, H. **Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide endosulfan.** New York: Springer-Verlag, 174 p., 1982.
- GRIER, H. J. Ovarian epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). **Journal of Morphology**, 243:265-281, 2000.
- GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: **Proceedings of the 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 2002.
- GUEDES, R. N. C. **Um breve histórico sobre os inseticidas organossintéticos.** Viçosa, UFV, 6p (apostila). 1990.
- GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis.** Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger. 223p., 1986.
- HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Effects of deltamethrin on excitability and contractility of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) heart. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, 159:1-9, 2014.
- HAZARIKA, R.; DAS, M. Toxicological impact of BHC on the ovary of the air-breathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 60:16-21, 1998.
- HENRY, L. KISHIMBA, M. A. Pesticide residues in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile Perch (*Lates niloticus*) from Southern Lake Victoria, Tanzania, **Environmental Pollution**, 140:348-354, 2006.
- HINTON, D. E.; LANTZ, R. C.; HAMPTON, J. A. Effect of age and exposure to a carcinogen on the structure of the medaka liver: a morphometric study. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, 65:239-49, 1984.
- HULL, K. I.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction (review). **Journal of Endocrinology**, 168:1-23, 2001.
- ISHAAYA, J. & HOROWITZ, A. R.. **Insecticides with novel modes of action: an overview**, pp. 1-24. In: Ishaaya & D. Degheele (Eds) *Insecticides with Novel Modes of Action*. Springer, Berlin, 1998.
- KLAUSEN, C.; CHANG, J. P.; HABIBI, H. R. The effect of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 129:511-516, 2001.

- LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P. A.; PEZZI DA SILVA, J. F.; VARI, R. P.; HAROLD, H.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p. 106-169, 2003. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. J. (Orgs.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS. 729 p., 2003.
- LOUREIRO, V. E.; HAHN, N. S.; ABUJANRA, F.; RUSSO, M. R.; FIGUEIREDO, H. R. Dieta e atividade alimentar de *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) (Osteichthyes, Erithrinidae) do reservatório da UHE de Segredo, PR, no primeiro ano de sua formação. In: **XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. 1995. Pontifícia Universidade Católica de Campinas.
- MARCON, L. **Morfologia ovariana no lambari *Astyanax bimaculatus* sob efeito do hormônio de crescimento**. UFV, Viçosa, 2008. 77 p. (Dissertação, Mestrado).
- MATUO, T. Formulação de defensivos agrícolas, pp. 11-16. Métodos de aplicação de defensivos agrícolas, pp. 17-37. In: **Técnicas de aplicação de defensivos agrícolas**. UNESP, Jaboticabal, 1990.
- MAZZONI, R.; MENDONÇA, R. S.; CARAMASCHI, E. P. Reproductive biology of *Astyanax janeiroensis* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 65:643-649, 2005.
- MELO, F. C. S. A.; MALDONADO, I. R. S. C.; BENJAMIN, L. A.; MATTA, S. L. P. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*) (Characidae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, 52:811-829, 2005.
- MICHALANY, J. Técnica histológica em Anatomia Patológica, com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico. São Paulo, EPU, 277 p., 1980.
- MIRANDA, A. C. L. **Reprodução de *Astyanax bimaculatus lacustris* em viveiros e estudo histológico e ultra-estrutural da atresia folicular de *Astyanax bimaculatus lacustris* e *Leporinus reinhardtii* em gaiolas de aquicultura**. UFMG, Belo Horizonte, 1996. 138 p. (Dissertação, Mestrado).
- MIRANDA, A. C. L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. **Tissue and Cell**, 31: 480-488, 1999.
- MOLINA, D. Anvisa baixa resolução proibindo agrotóxico Endosulfan a partir de 2013. Disponível em: <http://amarnatureza.org.br/site/anvisa-baixa-resolucao-proibindo-ogrotoxico-endossulfan-a-partir-de-2013,67995/>. Acessado em: 20/12/2010.
- MOTTA, R. L.; UIEDA, V. S. Habito alimentar da comunidade de peixes de um ambiente lótico tropical (Cuesta de Botucatu). In: **XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. 1995. Pontifícia Universidade Católica de Campinas.
- MURTY, A.S. **Toxicity of pesticides to fish**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 1988. v. 1, 178p.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology, Reproduction, Part. A.**, New York: Academic Press. 9:223-275, 1983.
- NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. **Comparative Biochemistry Physiology**, 105: 347-361, 1993.
- NAUMANN, K. **Synthetic pyrethroid insecticides: structure and properties** Berlin: Springer-Verlag. p. 3-15 e 183-191. 1990.

- NOVAKOSKI, G. C. Alimentação de peixes piscívoros antes e após a formação do reservatório de Salto Caxias, Paraná, Brasil. **Biota Neotropica**, 7(2):149-157, 2007.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; SILVA, P.H., PELLETIER, E.; AKAISHI, F.M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology Environmental Safety**, 51, 161–167, 2002.
- PEREIRA FILHO, H. P. **Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata, *Astyanax scabripinnis*, 1842 (Characidae: Teleostei) em condições de cativeiro**. UFV, Viçosa, 2000. 94p. (Dissertação, Mestrado).
- PEREIRA, V. M.; BORTOLOTO, J. W.; KIST L. W.; AZEVEDO, M. B.; FRITSCH, R. S.; OLIVEIRA, R. D. A. L.; PEREIRA, T. C.; BONAN, C. D.; VIANNA, M. R.; BOGO, M. R. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology**, 33(3):469-75, 2012.
- PEYON, P.; BALOCHE, S.; BURZAWA-GÉRARD, E. Pontentiating effect of growth hormone on vitellogenin synthesis induced by 17 β -estadiol in primary culture of female silver eel (*Anguilla anguilla* L.) hepatocytes. **General and Comparative Endocrinology**, 102:263-273, 1996
- PINHEIRO, S.; NARS, N. Y.; LUZ, D. **Agricultura ecológica e a máfia dos agrotóxicos no Brasil**. Rio de Janeiro: Edição dos Autores, 1998. In: Azevedo, A.A. Análise dos impactos ambientais da atividade agropecuária no cerrado e suas inter-relações com os recursos hídricos na região do Pantanal. Disponível em: assets.wwf.org.br/. Acessado em: outubro de 2008.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Oxford: Fishing News Books**, p. 339-352, 1994.
- PRADO, P. S.; SOUZA, C. C.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Reproductive disruption in lambari *Astyanax fasciatus* from a Southeastern Brazilian reservoir. **Ecotoxicology Environmental Safety**, 74(7):1879-87, 2011.
- RANZANI-PAIVA, M. J. T.; TAKEMOTO, R. M., LIZAMA, M. de los A. P. **Sanidade de organismos aquáticos**. Editora Varela. 2004. 263-272.
- REDDING, J. M.; PATIÑO, R. **Reproductive physiology**. In: EVANS, D. H. (Ed.). The physiology of fishes. Boca Raton (Florida): CRC Press, Marine Sciences Series, 1993. 503-534.
- RIBEIRO, V. M. A.; BAZZOLI, N.; MARIA, T. A.; SANTOS, G. B. Ultrastructural changes in female hepatocytes during ovarian maturation of *Steindachnerina insculpta* (Pisces: Curimatidae). **Brazilian Journal of Biology**, 66: 957-962, 2006.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina, PR: Grafmarke, 2005. p. 591.
- ROSA, A.V. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo: Ed.Atual, 1998. p.10-17, 52-63.
- RÜEGG, E.F.; PUGA, F.R.; SOUZA, M.C.M.; ÚNGARO, M.T.S.; FERREIRA, M.S.; YOKOMIZO, Y.; LMEIDA, W.F. **Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde**. In: MARTINE, G. & GARCIA, R.C. (Eds.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed.Caetés, 1987. p.171-207.
- SANTIN, M.; DI BENEDETTO, M.; BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; SUIBERTO, M. R. Aspectos da dieta de larvas de *Astyanax janeiroensis* (EIGENMANN,1908) (Osteichtyes, Characidae) no reservatório de Guaricana, Rio Arraial, Estado do Paraná. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 31:73-80, 2005.

- SANTOS, J. D.; VANZETTO, G. V.; GHISI, N. C.; PRIOLI, A. J.; OLIVEIRA, E. C. Histopatologia de fígado de *Astyanax* aff. *paranae* (pisces) como indicador de contaminação ambiental em corpos hídricos do centro-noroeste do paraná. In: **Simpósio Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. Campo Mourão. PR, 2013.
- SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Apoptosis in the involution of postovulatory follicles of *Leporinus taeniatus* LÜTKEN, 1874 (Pisces: Anostomidae) submitted to the induced spawning. In: **XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis**. Proceedings... Caxambu, MG, 2003.
- SANTOS, H. B.; SATO, Y.; MORO, L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Relationship among follicular apoptosis, integrin β 1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. **Cell and Tissue Research**, 332:159-170, 2008a.
- SANTOS H.B.; THOME´, R. G.; ARANTES, F.P.; SATO Y.; BAZZOLI, N.; E. RIZZO. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). **Theriogenology**, 70:1449–1460, 2008b.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6:75-86, 1997.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **American Zoologist**, 26:173-192, 1986.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zoological Science**, 6: 211-231, 1989.
- SENTHILKUMARAN, B.; YOSHIKUNI, M.; NAGAYAMA, Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 215:11-18, 2004.
- SILVA BARNI, M. F.; GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K. S. Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 99:45-53, 2014.
- SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 19:1117-1127, 2003.
- STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 23p., (Report B 81/86), 1986.
- SUAREZ, Y. R.; SOUZA, R.; PEREIRA, R. A. C. Ecologia alimentar de *Astyanxa bimaculatus* (CHARACIDAE, TETRAGONOPTERINAE), no canal de Tamengo Corumbá, MS. In: **XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1995.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2 edico. Tokio, 1995.
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Pteo Ambiental, Instituto Biológico. **O Biológico**, São Paulo, 64:135-142, 2002. Disponível em: <http://www.geocities/~esabio/tomita.htm>. Acessado em: junho 2008.
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 6: 287-318, 1996.

- VASCONCELLOS, M. G., VERANI, N. F. **Avaliação dos efeitos toxicológicos crônicos do herbicida Roundup (Glifosato) sobre a diferenciação gonadal do bagre *Rhamdia hilari* (Valenciennes, 1840)**. (Dissertação, Mestrado). 2000. Disponível em: http://www.fafibe.br/revistaonline/arquivos/cienciabiologicas/022-odila-herbicida_roudup.pdf. Acessado em: outubro/2008.
- VITULE, J. R. S.; ARANHA, J. M. R.; Ecologia alimentardo lambari, *Deuterodon langei* Travassos, 1957(Characidae, Tetragonopterinae), de diferentes tamanhos em um riacho da Floresta Atlântica, Paraná (Brasil). **Acta Biologica Paranaense**, 31: 137-150, 2002.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. The fate organic pollutants in individuals and in ecosystems. In: **Principles of ecotoxicology** (C.H. Walker et al.). London: Taylor & Francis. 1996. 67-76.
- WALLACE, R. A.; SELMAN, K. Celular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, 41:199-222, 1981.
- WARE, G. W. Inseticidas. In: **Pesticide book** (4th ed.). Fresno: Thompson Publ., 1994. 41-44 e 53-54.
- WOYNAROVICH, E.; HORVATH, L. The artificial propagation of warm-water finfish - A manual for extension. **FAO Fish Technical Paper**, 1980.v. 201, 183p.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CAPÍTULO 1

EFEITOS DO INSETICIDA THIODAN[®] SOBRE A MORFOLOGIA HEPÁTICA DE FÊMEAS DE LAMBARIS *Astyanax bimaculatus*

RESUMO

O Thiodan[®] é um tóxico que pode causar alterações morfológicas nos tecidos de peixes expostos a ele dependendo da concentração. A fim de investigar possíveis alterações este estudo avaliou a morfologia hepática de fêmeas de lambaris *Astyanax bimaculatus* expostas ao Thiodan[®] por 96 horas em quatro diferentes experimentos com três concentrações subletais de 1,15; 2,3 e 5,6 µg/L de Thiodan[®], além de um grupo controle, livre de tóxico. As fêmeas foram divididas em quatro experimentos: sem aclimação e sem alimentação; sem aclimação e alimentados; com aclimação de 10 dias e sem alimentação; e com aclimação de 10 dias e alimentados. Foi observado que a ação do Thiodan[®] em concentrações subletais não afetou a estrutura morfológica do fígado como um todo, mas foram observadas alterações em locais isolados do parênquima hepático. Houve depleção de glicogênio, deformação nuclear e citoplasmática, hipertrofia nuclear e citoplasmática, hiperemia e degeneração celular nos hepatócitos nas diferentes concentrações. No entanto, o Índice de Alteração Histológica (IHA) e o Valor Médio de Alteração (VMA) demonstraram que as alterações observadas nos fígados dos lambaris não foram severas, sendo, na maioria, alterações de estágio I e II, de forma leve a moderada, com dano reparável do tecido hepático em todas as concentrações. Além disso, houve alteração do diâmetro do núcleo e citoplasma dos hepatócitos nos diferentes experimentos, e maior quantidade de núcleos de hepatócitos nos grupos expostos ao Thiodan[®] associada à redução na quantidade de citoplasma. Conclui-se que o Thiodan[®] influenciou o metabolismo hepático como resposta adaptativa celular. A incidência de alterações histológicas no fígado dos lambaris coletados nos diferentes experimentos indica o comprometimento da saúde destes peixes e mostra que os parâmetros analisados podem ser empregados como biomarcadores da contaminação ambiental nesta espécie.

Palavras-chave: histopatologia, fígado, peixe, endossulfan, ecotoxicologia.

1. INTRODUÇÃO

O Thiodan[®] é um inseticida de uso comercial que consiste na mistura de dois isômeros ativos, sendo 70% α -endosulfan e 30% β -endosulfan. Endosulfan é um hidrocarboneto clorado usado como inseticida de amplo espectro, que controla insetos por ação de contato e ingestão (Stumpf & abhaver, 1986; Chakrabarty et al., 2012). Atualmente, foi banido em vários países pela sua alta toxicidade (Molina, 2010). O tóxico pode chegar ao meio aquático pelo escoamento superficial e infiltração no solo a partir da irrigação agrícola e das chuvas, colocando em risco os organismos que ali residem (Walker et al., 1996; Capkin et al., 2006; Glover et al., 2007). Conseqüentemente, o endosulfan pode acumular nos tecidos destes organismos, como já observado por Henry & Kishimba (2006) na espécie de peixe *Oreochromis niloticus*. A União Européia estabelece como limite máximo de endosulfan em gordura o valor de 0,05mg/kg⁻¹ (EPA 2002), e em água doce 0,22 μ g/L⁻¹ (EPA 1980). A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente, levando em consideração a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA - n° 357/2007, estabelece o valor limite de 0,056 μ g/L de resíduo do referido inseticida e seus metabólitos nas águas doces de classe 1.

A sensibilidade ao endosulfan pelos organismos aquáticos tem sido bem descrita na literatura (Capkin et al., 2006; Ballesteros et al., 2007; Pereira et al., 2012). O produto é extremamente tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito pequenas (Cengiz et al., 2001). No entanto, a sensibilidade pode variar entre os sexos, assim como foi observado nos peixes adultos da espécie *Jenynsia multidentata* sob efeito do endosulfan por 96 horas (Ballesteros et al., 2007). Neste trabalho, a CL₅₀ em peixes machos foi de 0,72 μ g/L⁻¹, enquanto nas fêmeas foi de 1,31 μ g/L⁻¹, valores atribuídos às diferenças de maior reserva de lipídeos nas fêmeas que nos machos. Em outros estudos, Capkin et al. (2006) utilizaram 19,78 μ g/L⁻¹ em *Oreochromis mikyss* por 24 horas de exposição ao tóxico, o que causou além da morte de 50% dos peixes, convulsões, nado errático, separação das lâminas brânquiais e necrose do fígado e, como Cengiz et al. (2001), reportaram lesões similares no peixe-mosquito *Gambusia affinis*.

O sulfato de endosulfan é um dos produtos derivados do metabolismo do endosulfan, sendo considerado o principal metabólito devido à sua importância toxicológica (Stumpf & abhaver, 1986), e por ser mais estável no meio ambiente do que

quando está em sua fórmula original (Ali et al., 1984). Decorrente disto, os peixes, quando expostos a este inseticida, podem apresentar alterações morfológicas significativas no fígado (Capkin et al., 2006; Coimbra et al., 2007; Glover et al., 2007). Estas alterações morfológicas podem ser o surgimento de vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, alteração dos vasos sinusoides, alteração do tamanho dos hepatócitos e necroses, o que, de acordo com alguns autores, pode influenciar a síntese de vitelogenina no fígado para formação dos folículos vitelogênicos em período reprodutivo (Senthilkumaran et al., 2004; Al-Ghais, 2013; Silva Barni et al., 2014). Além disso, as funções hepáticas podem ser influenciadas pelas diferenças na capacidade de exposição a contaminantes, condição fisiológica, armazenamento de energia e hábitos alimentares (Ribeiro et al., 2006; Al-Ghais, 2013; Silva Barni et al., 2014).

O lambari *Astyanax bimaculatus* foi escolhido como organismo experimental, pois é muito representativo no ecossistema, sendo encontrado desde o Nordeste brasileiro até a bacia do rio da Prata na Argentina (Barbieri et al., 1982). É um peixe de pequeno porte e de fácil manutenção em laboratório.

Este estudo teve como objetivo verificar a ocorrência de alterações histológicas no fígado de fêmeas de *A. bimaculatus* em maturação avançada e avaliar a intensidade de alteração deste órgão em peixes alimentados e desprovidos de alimento, durante ensaios subletais agudos com o tóxico Thiodan[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária, onde foram realizados o teste de toxicidade aguda e o teste subletal. As atividades de coleta, fixação e inclusão dos fragmentos dos fígados, microtomia, coloração de lâminas histológicas e as análises histológicas e morfométricas foram realizadas nos Laboratórios de Peixes e de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV (DVT/UFV).

2.1. Animais

Foram utilizadas fêmeas de *A. bimaculatus* obtidas de tanques de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG. Para o presente estudo, foram selecionadas

fêmeas de lambari em maturação avançada com peso de $11,52 \pm 2,0$ g e comprimento total de $9,12 \pm 0,64$ cm. As características para a escolha dos animais em maturação avançada se basearam em aspectos corporais, como ventre abaulado, poro genital dilatado e vascularizado.

Os peixes foram transportados para o Biotério de Peixes do DVT/UFV. Os aquários onde os animais foram mantidos possuem capacidade de 50 litros numa densidade de 0,5g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, temperatura controlada e monitoramento duas vezes ao dia. Todos os aquários possuíam sistema de filtração (250L/h), e aeração contínua da água para garantir o bem-estar dos peixes. Os peixes foram alimentados com ração comercial Purina contendo 35% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo da piscicultura.

As características da água utilizada no teste em sistema estático foram mantidas de acordo com as recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2007) com temperaturas de $25,5 \pm 1,0$ °C, livre de cloro, pH $7,2 \pm 0,3$; oxigênio dissolvido $6,9 \pm 0,6$ mg/L⁻¹ e dureza total (CaCO₃) $28,15 \pm 5,94$ mg/L⁻¹.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (protocolo 24/2009). O médico veterinário responsável foi o Doutor Laércio dos Anjos Benjamin (CRMV-MG 3387).

2.2. Agrotóxico

Para a avaliação proposta no presente trabalho, foi utilizado o inseticida organoclorado Thiodan[®] (Bayer) em sua apresentação comercial com 350g/L⁻¹ de endosulfan.

2.3. Teste da toxicidade aguda em sistema estático - CL₅₀

O teste de concentração letal (CL₅₀) que avalia a concentração responsável pela mortalidade de 50% dos animais foi realizado em sistema de água estático de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007) com os animais mantidos em restrição alimentar que se iniciou 24 horas antes do início do experimento e perdurou durante todo o teste (96 horas). Essa restrição alimentar foi realizada para evitar acúmulo de matéria orgânica que poderia interferir na ação do agrotóxico.

Para o teste foram selecionadas 120 fêmeas adultas de lambari em maturação avançada. O agrotóxico utilizado foi o Thiodan[®] (Bayer), com 350g/L⁻¹ de endosulfan. Foram utilizadas três repetições com cinco peixes cada, para cada concentração de

Thiodan[®] adotada, sendo os grupos assim classificados: controle ($0\mu\text{g/L}^{-1}$), $1,5\mu\text{g/L}^{-1}$, $3,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $6,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $12,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $24,0\mu\text{g/L}^{-1}$, $48,0\mu\text{g/L}^{-1}$ e $96,0\mu\text{g/L}^{-1}$. As concentrações foram distribuídas em recipientes plásticos com 1,5L de água dos próprios aquários.

Foram realizadas verificações de mortalidade a cada seis horas até 96 horas (zero, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 60, 66, 72, 78, 84, 90 e 96 horas) removendo-se os animais mortos, o que proporcionou menores interferências pela decomposição dos peixes, gerando maior confiança da mortalidade apresentada ser em função da toxicidade do princípio ativo endossulfan sinergicamente à ação dos solventes e demais compostos do inseticida. Para acompanhamento da temperatura foi acondicionado 1,5L de água do mesmo aquário, em um recipiente idêntico, de forma que qualquer variação na temperatura pudesse ser medida sem provocar estresse adicional a nenhum grupo. O programa utilizado para o cálculo da CL_{50} foi o TOXCALC, determinando o valor e intervalo de confiança pelo método PROBITUS ($P < 0,05$).

2.4. Teste da toxicidade subletal em sistema estático

O teste de toxicidade subletal com o endossulfan foi realizado baseando-se principalmente nas normas técnicas para teste em sistema estático de acordo a NBR 15088 (ABNT, 2007).

As fêmeas foram expostas ao Thiodan[®] (endossulfan 350g/L^{-1}) por 96 horas em quatro tratamentos diferentes: 1) experimento sem aclimatação de 10 dias e sem alimentação; 2) experimento sem aclimatação e com alimentação; 3) experimento com aclimatação de 10 dias e sem alimentação; e 4) experimento com aclimatação de 10 dias e com alimentação. Todos os experimentos foram constituídos por três concentrações diferentes do Thiodan[®] inferiores à CL_{50} pré-determinada em laboratório de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007) e um grupo controle sem tóxico. As concentrações utilizadas em cada experimento foram de $1,15$; $2,3$ e $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$, com três repetições sob as mesmas condições para cada concentração.

2.5. Análises morfológicas e morfométricas

Após 96 horas de experimento, foram coletados 96 peixes, sendo seis animais em cada grupo nos diferentes experimentos. Logo em seguida, os fígados foram coletados após os peixes terem sido anestesiados com benzocaína (1:10.000), e eutanasiados pela secção transversal da coluna vertebral na região do opérculo.

Para a histologia, todas as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, por 24 horas, e incluídos em resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin[®]). Em seguida, secções com 3µm de espessura foram coradas utilizando azul de toluidina para as análises morfológicas e morfométricas. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck[®]), analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus, e as imagens foram obtidas com câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus.

As lâminas histológicas foram analisadas em toda sua extensão, e foram fotografados 10 campos ao acaso em objetiva de 40X, para análises morfológicas e morfométricas que pudessem ser representativas do efeito do Thiodan[®] no tecido hepático. Estas alterações foram comparadas com o padrão de organização dos fígados dos grupos controles.

As alterações histológicas foram avaliadas semiquantitativamente de duas formas: 1) por meio do cálculo do Valor Médio de Alteração (VMA), com base na incidência de lesões. Para tanto, atribuiu-se um valor numérico para cada órgão conforme a escala: grau 1 (ausência de alteração histológica), grau 2 (ocorrência de lesões pontuais), e grau 3 (lesões amplamente difusas pelo órgão) em 10 campos fotografados; e 2) pelo cálculo do Índice de Alteração Histológica (IAH), com base na severidade de cada lesão de acordo com Schwaiger et al. (1997). Para tanto, as alterações foram classificadas em estádios progressivos quanto ao comprometimento das funções do órgão: alterações de estágio I, que não comprometem o funcionamento do órgão; de estágio II, mais severas e que prejudicam o funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis (adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994) (Tabela 1). O valor de IAH foi calculado para cada animal utilizando a fórmula: $IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$, sendo I, II e III correspondentes às alterações de estádios I, II e III, respectivamente. O valor médio de IAH foi dividido em cinco categorias, que seguiu metodologia de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic (1994): 0-10= funcionamento normal do tecido; 11-20= dano leve a moderado do tecido; 21-50= dano moderado a severo do tecido; 51-100= dano severo do tecido; maior que 100= dano irreparável do tecido. Este índice permitiu a comparação da severidade das lesões hepáticas entre os peixes expostos às diferentes concentrações do tóxico.

Para as análises morfométricas foram realizadas medições dos diâmetros de dez núcleos e citoplasmas de hepatócitos para cada animal. As medidas foram obtidas por meio do programa Image-Pro Plus, traçando duas linhas perpendiculares respeitando-se

os limites do núcleo e do citoplasma do hepatócito em análise. Além disso, foram quantificados pontos de interseção sobre núcleo de hepatócito, citoplasma de hepatócito, capilares sinusoides e macrófagos em 10 campos, utilizando-se gradícula com 441 pontos de interseção, com 100µm de lado e uma área de 10000µm², totalizando 4410 pontos/animal para o cálculo da constituição tecidual hepática.

Tabela 1. Classificação das alterações histológicas do fígado quanto ao estágio de comprometimento das funções teciduais (adaptado de Poleksic & Mitrovic-Tutundzic, 1994).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS HEPÁTICAS	ESTÁDIO
1. Alterações nos hepatócitos	I
Atrofia nuclear	I
Deformação do contorno celular	I
Deformação do contorno nuclear	I
Hipertorfia celular	I
Hipertorfia nuclear	I
Núcleo na periferia da célula	I
Vacuolização citoplasmática	I
Degeneração citoplasmática	II
Degeneração nuclear	II
Núcleo picnóticos	II
Rompimento celular	II
2. Alterações nos vasos sanguíneos	
Hiperemia	II
Ruptura de vasos	II
3. Necrose	
Necrose focal	III

A quantidade de glicogênio nos hepatócitos foi avaliada em toda extensão da lâmina de forma semiquantitativa, sendo evidenciada pela reação histoquímica de Periodic Acid Schiff (PAS), seguida de contracoloração com hematoxilina, segundo Michalany (1980). Para melhor compreensão dos resultados, as marcações foram determinadas na seguinte escala: 0- ausência de glicogênio, 1- pouco glicogênio, 2- quantidade moderada de glicogênio, 3- muito glicogênio. Após esta análise, foi calculada uma média do conteúdo de glicogênio dos hepatócitos nos grupos controles e grupos expostos ao tóxico nas diferentes concentrações.

2.6. Índice hepatossomático (IHS)

Para o cálculo do IHS, foram registrados, para cada exemplar, os dados biométricos de peso corporal (PC, em g) e peso do fígado (PF, em g). Os valores médios e os desvios padrão do índice hepatossomático ($IHS = PF \times 100 / PC$) foram calculados para cada animal, em cada um dos grupos nos diferentes experimentos, nas diferentes concentrações.

2.7. Análises estatísticas

Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Os dados foram avaliados pelo Software Statistica 7.0 por meio da análise de variância (ANOVA). Após o teste de distribuição normal, os dados foram comparados entre os grupos controle e grupos expostos ao Thiodan[®] usando análise de variância one-way seguida pelo teste de Tukey ou Duncan. Quando os dados não apresentaram uma distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. $P < 0,05$ foi utilizado como critério de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Determinação da CL_{50-96h}

Nas primeiras seis horas de experimento observou-se mortalidade de 100% de peixes na concentração de $96 \mu\text{g/L}^{-1}$, 94,4% de mortalidade em $48 \mu\text{g/L}^{-1}$, 73,3% de mortalidade em $24 \mu\text{g/L}^{-1}$, 26,6% de mortalidade em $12 \mu\text{g/L}^{-1}$ e 20% de mortalidade em $6 \mu\text{g/L}^{-1}$, sendo um total de 44,7% dos peixes que morreram nas diferentes concentrações do Thiodan[®] nas primeiras seis horas. Na concentração de $3 \mu\text{g/L}^{-1}$ morreu apenas um peixe no final das 96 horas. Foi observado 100% de mortalidade na concentração de $48 \mu\text{g/L}^{-1}$ em até 12 horas de exposição ao tóxico. As menores mortalidades foram registradas nas concentrações de Thiodan[®] de $3 \mu\text{g/L}^{-1}$ e $6 \mu\text{g/L}^{-1}$, sendo, respectivamente, 94,4% e 80% de sobrevivências. A concentração de $1,5 \mu\text{g/L}^{-1}$ de Thiodan[®] e o grupo controle não tiveram mortalidade. A temperatura da água apresentou variação entre $22,0^\circ\text{C}$ e $24,5^\circ\text{C}$, com média de $23,3 \pm 0,72^\circ\text{C}$.

Os valores registrados determinaram CL_{50-96hs} de $13,67 \mu\text{g/L}^{-1}$ para as fêmeas de *A. bimaculatus*, com intervalo de confiança de 10,1 a $18,4 \mu\text{g/L}^{-1}$ ($P < 0,05$).

3.2. Teste da toxicidade subletal em sistema estático

Durante a exposição ao Thiodan[®] por 96 horas, foi observado comportamento anormal dos peixes, com nado errático, tentativa de fuga dos aquários, demonstração de agressividade com os demais peixes, busca de oxigênio na superfície e respiração branquial acelerada. Após 24 horas do início, os animais apresentavam comportamento normal e procuravam pelo alimento. Estas mudanças comportamentais ocorreram em todas as concentrações do agrotóxico utilizadas, com maior intensidade na concentração de 5,6µg/L do experimento sem aclimação/sem alimentação, cuja temperatura média foi superior à dos demais experimentos (Tabela 2).

3.3. Morfologia e frequência das alterações histológicas nos fígados

Morfologicamente, o fígado dos lambaris apresentou hepatócitos hexagonais com citoplasma de aspecto granular e vacuolizado, núcleo arredondado central, nucléolo evidente e presença de hepatopâncreas. Os hepatócitos estavam dispostos em cordões margeando os sinusoides (Figura 1 A).

Os infiltrados leucocitários foram observados nos grupos controles e nos grupos expostos ao Thiodan[®] (Figura 1 B).

A vacuolização foi evidente nos hepatócitos das fêmeas analisadas (Figura 1 A). No fígado das fêmeas do experimento sem aclimação/com alimentação na concentração de 5,6µg/L⁻¹ houve a presença característica de acúmulos de lipídios nos hepatócitos, com a presença de vesículas claras, grandes e envolvidas por glicogênio marcado positivamente pela reação de PAS (Figura 1 C). Além disso, foram observados núcleos deslocados para a periferia celular. No experimento sem aclimação/sem alimentação na concentração de 5,6µg/L⁻¹ houve reação negativa pelo PAS no citoplasma dos hepatócitos (Figura 1 D).

As alterações de estágio I, como deformação do contorno nuclear, núcleo na periferia da célula, atrofia nuclear, desarranjo dos cordões hepáticos, hipertrofia celular e nuclear (Figuras 1 E-G; Figuras 2 A-B) foram observadas nos grupos controles e naqueles expostos ao Thiodan[®], sendo que nos grupos tratados houve maior frequência. O deslocamento do núcleo para a periferia do hepatócito foi observado nas fêmeas do experimento sem aclimação/com alimentação na concentração de 5,6µg/L⁻¹.

Quanto às alterações de estágio II, a degeneração nuclear (Figura 2 C) foi raramente presente na maioria das concentrações nos diferentes experimentos. A degeneração citoplasmática (Figura 2 D) foi pouco frequente em todos os experimentos,

assim como a hiperemia (Figura 2 E). A presença de núcleos picnóticos (Figura 2 F) foi mais frequente no experimento sem aclimação/com alimentação e no experimento com aclimação/com alimentação.

Os VMAs variaram entre 1,25 e 2,28 nas fêmeas analisadas, sendo a menor média observada nos grupos controles e as maiores nos grupos expostos ao Thiodan[®], o que mostra incidência maior de alterações pontuais no fígado nos animais dos grupos tratados. Os VMAs do fígado na espécie estudada foram superiores ($P < 0,05$) nos peixes expostos ao agrotóxico quando comparado aos peixes dos grupos controles (Tabela 3). O IAH das fêmeas nos diferentes experimentos apresentaram valores superiores ($P < 0,05$) nos grupos expostos ao Thiodan[®] quando comparados como os grupos controles (Tabela 4), com exceção do experimento sem aclimação/sem alimentação na concentração de $1,15\mu\text{g/L}^{-1}$ de endosulfan, que não houve diferença ($P > 0,05$).

3.4. Diâmetro dos núcleos e citoplasmas de hepatócitos

Os resultados demonstraram aumento ($P < 0,05$) no diâmetro dos núcleos de hepatócitos dos peixes expostos ao Thiodan[®] nas concentrações de $1,15\mu\text{g/L}^{-1}$ e $2,3\mu\text{g/L}^{-1}$ quando comparados ao grupo controle no experimento sem aclimação/sem alimentação. Por outro lado, foi registrada diminuição ($P < 0,05$) do diâmetro dos núcleos de hepatócitos no experimento com aclimação/com alimentação quando comparados aos peixes expostos ao Thiodan[®] na concentração $1,15$ e $2,3\mu\text{g/L}^{-1}$ em relação ao grupo controle (Tabela 5).

O diâmetro do citoplasma apresentou aumento no experimento sem aclimação/sem alimentação e no experimento com aclimação/sem alimentação com diferença ($P < 0,05$) registrada entre os peixes do grupos controles e expostos ao agrotóxico, com exceção do experimento com aclimação/sem alimentação na concentração de $2,3\mu\text{g/L}^{-1}$ (Tabela 6). Entretanto, houve diminuição nos citoplasmas de hepatócitos nos peixes expostos ao agrotóxico em relação ao grupos controles ($P < 0,05$) nos experimentos sem aclimação/com alimentação e no experimento com aclimação/com alimentação (Tabela 6).

3.5. Quantificação de núcleos e citoplasmas de hepatócitos, macrófagos e capilares sanguíneos no tecido hepático

Nas contagens de pontos de interseção sobre núcleos de hepatócitos (Tabela 7) foram observadas quantidades superiores nos peixes expostos ao agrotóxico em relação

aos grupos controles ($P < 0,05$). Na quantificação dos citoplasmas de hepatócitos foram registradas contagens inferiores ($P < 0,05$) nos peixes expostos ao agrotóxico em relação aos grupos controles, exceto no experimento sem aclimação/sem alimentação (Tabela 8).

Na contagem de pontos de interseção sobre macrófagos não houve aumento significativo ($P > 0,05$) nos peixes expostos ao agrotóxico em relação ao controle (Tabela 9). Em relação à contagem de pontos de interseção sobre capilares sinusoides, a contagem foi igual na maioria dos peixes expostos ao agrotóxico quando comparados com os controles, apresentando diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos expostos do experimento sem aclimação/com alimentação nas concentrações de 1,15 e $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$ (Tabela 10).

3.6. Quantificação do glicogênio hepático

Em todos os grupos controles e tratados nos diferentes experimentos, foram registrados valores médios para o glicogênio variando entre 0,10 e 3,00. No experimento sem aclimação/sem alimentação no grupo tratado da concentração de $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$ de Thiodan[®] foi registrada a menor média (Tabela 11). No entanto, houve diferença ($P < 0,05$) do glicogênio hepático na concentração de $5,6\mu\text{g/L}$ quando comparada com as concentrações de 1,15 e $2,3\mu\text{g/L}^{-1}$ (Tabela 11 e Figura 1 D).

3.7. Índice hepatossomático

As fêmeas dos grupos experimentais expostos ao Thiodan[®] não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) nos valores do IHS quando comparados com os grupos controles (Tabelas 12). Entretanto, houve diferença ($P < 0,05$) do IHS na concentração de $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$ quando comparada com as concentrações de 1,15 e $2,3\mu\text{g/L}^{-1}$ no experimento sem aclimação/sem alimentação (Tabela 12).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, o lambari, apesar de ser de pequeno porte, apresentou uma CL_{50} de $13,67\mu\text{g/L}^{-1}$ em 96 horas, sendo mais resistente que adultos de tilápia nilótica. Musanhi (1987) determinou a CL_{50} 96, 48 e 24 horas de exposição ao endosulfan para tilápia nilótica adulta, encontrando valores de 1,42, 3,80 e $10,3\mu\text{g/L}^{-1}$. Nas primeiras 24 horas de ação do Thiodan[®], nas concentrações subletais de 1,15, 2,3 e $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$, as fêmeas do presente estudo apresentaram comportamentos alterados, assim como foi

observado na espécie *Danio rerio* exposta ao endosulfan por 96 horas na concentração de $2,4\mu\text{g/L}^{-1}$, além desta espécie ter apresentado uma diminuição do nível de acetilcolinesterase (AChE) (Pereira et al., 2012). Por outro lado, em estudo realizado por Hernan da Cuña et al. (2011) com a espécie *Cichlasoma dimerus* exposta ao endosulfan por 96 horas nas concentrações de 0,25, 1, 2, 3, 4 e $16\mu\text{g/L}^{-1}$, os peixes exibiram comportamento indicativo de neurotoxicidade, mas não foram encontradas diferenças na atividade da AChE. Estes estudos fornecem evidências adicionais de efeitos deletérios da exposição ao endosulfan sobre o sistema nervoso, o que contribui para as observações obtidas no presente estudo.

As descrições histológicas hepáticas nas fêmeas do presente estudo foram semelhantes ao que foi caracterizado em outros peixes, onde os hepatócitos organizam-se em fileiras ou cordões duplos em formato de placas representando um sistema de fundo-cego, anastomosado e de túbulos ramificados (Metcalf, 1998; Hinton et al., 2001).

A histologia e a fisiologia do fígado são similares nos vertebrados. Ferguson (1989) e Gingerich (1982) descrevem que existem algumas diferenças estruturais marcadas no parênquima hepático de peixes, em especial pela ausência de lobulação, espaço porta clássico e ausência de zonação no parênquima hepático, o que permite fluxo lento de sangue nos sinusoides com penetração diminuída de químicos nos hepatócitos.

A presença de porções pancreáticas dentro do fígado do lambari é descrita na literatura (Santos et al., 2013). Uma das funções das células pancreáticas distribuídas pelo fígado é a produção da enzima de biotransformação citocromo P450, diferente do que é observado para mamíferos, onde esta enzima é ausente (Hahn et al., 1994; Stegeman, 1991). A presença de células pancreáticas em estruturas do tecido hepático de *A. bimaculatus* sugere a provável função dessas células em auxiliar na desintoxicação. Outra importante estrutura na detoxificação é a presença das células dos endotélios capilares, nas quais tem sido confirmada e identificada a presença de enzimas citocromo P450 por meio de técnicas de imunomarcagem (Lorenzana et al., 1986). Sendo assim, a integridade estrutural dos capilares permanece intacta e sem comprometimento das possíveis funções celulares que estas estruturas podem desempenhar no tecido hepático de *A. bimaculatus* expostos ao Thiodan[®].

A ausência de estagnação biliar nos fígados das fêmeas de *A. bimaculatus* é um fator importante de que o Thiodan[®] não interferiu na fisiologia de excreção biliar nos

diferentes experimentos. Histopatologicamente, este tipo de alteração é observado nos citoplasmas dos hepatócitos com a presença de grânulos castanho-amarelados. Esta alteração consiste na manifestação fisiopatológica de uma condição causada pela falta de metabolismo e excreção biliar (Pacheco & Santos, 2002), uma vez que a bile sintetizada pelos hepatócitos permanece no interior das células, não sendo liberada para o tubo digestivo (Simonato et al., 2008). Este tipo de alteração pode ser encontrado em peixes expostos a tóxicos (Pacheco & Santos, 2002) e também em peixes que apresentam algum problema nutricional quando são mantidos em cativeiros (Langiano & Martinez, 2008). No entanto, no presente estudo não foram registradas essas evidências, o que sugere que a alimentação nos grupos tratados com ração comercial de todos os experimentos não interferiu nas funções biliares.

Os agregados macrofágicos estão relacionados à quebra de eritrócitos (Herraez & Zapata, 1986), apresentação de antígeno (Ellis, 1980), armazenamento de ferro e detoxicação de substâncias endógenas e exógenas (Herraez & Zapata, 1986). Hartley et al. (1996) propuseram a utilização do agregado macrofágico como biomarcador de poluição aquática a partir da quantificação destas estruturas. Existem alguns estudos comparativos em diferentes espécies que têm demonstrado variações no número, tamanho e pigmentação destas estruturas em relação à idade, nutrição e estado de saúde (Blazer et al., 1987; Ferguson, 1989; Agius et al., 2003). Nos agregados podem ser observados pigmentos do tipo lipofuscina, ceróide, hemossiderina e melanina (Wolke, 1992; Wolf & Wolfe, 2005), mas no presente estudo não foram evidenciadas nenhuma destas estruturas.

No fígado das fêmeas do grupo experimental sem aclimação/com alimentação na maior concentração de $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$ houve a presença característica de acúmulos de lipídios nos hepatócitos de dois peixes. No entanto, existem várias condições de acúmulos de lipídios nos hepatócitos associados com a exposição aos tóxicos (Thiyagarajah et al., 1985; Biagianti-Risbourg et al., 1995; Lumbertdacha et al., 1995; Handy et al., 1999; Fanta et al., 2003). Glover et al. (2007) submetem o peixe salmão do Atlântico a dieta de $4\mu\text{g/kg}$ de endossulfan por 14 e 35 dias, sendo observadas evidências de lipídeos nos hepatócitos. O aparecimento destas estruturas nas fêmeas de *A. bimaculatus* foi insignificante nos tecidos hepáticos, mas foram contabilizadas como respostas individuais, sugerindo uma disfunção hepática causada pelo Thiodan[®] que pode comprometer a fisiologia hepática destas fêmeas.

No presente estudo, as frequências de alterações morfológicas indicam que a ação tóxica do Thiodan[®] provocou uma distribuição de lesões de incidência leve a moderada no tecido hepático nos diferentes experimentos, sendo que nas maiores concentrações do tóxico houve mais incidências de alterações. As alterações observadas nos fígados dos lambaris não foram severas, isto é, não apresentaram necrose, sendo que a maioria das alterações são de estádios I e II, com dano reparável do tecido hepático. As alterações histológicas têm sido relatadas em peixes expostos a ambientes poluídos (Braunbeck et al. 1990; Takashima et al., 1995; Schwaiger et al., 1997). Da mesma forma, a frequência das alterações pode indicar disfunções induzidas por agentes tóxicos, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ficam reduzidas, levando a uma possível redução geral nas funções desempenhadas por este órgão (Hinton & Laurén, 1990; Oliveira Ribeiro et al., 2002; Pacheco & Santos, 2002; Langiano & Martinez, 2008). Este resultado sugere que o Thiodan[®] pode comprometer as funções hepáticas, mesmo em concentrações muito baixas nos diferentes experimentos, independentemente do peixe estar sendo alimentado ou não.

As alterações dos diâmetros de núcleos de hepatócitos podem ser consideradas resposta ao agente estressor, sendo indicativo da ativação da função hepática em decorrência do aumento da atividade metabólica contra as condições adversas (Stephen et al., 1993; Takashima & Hibiya, 1995; Langiano & Martinez, 2008). Por outro lado, a diminuição nuclear pode estar relacionada possivelmente com a multiplicação de hepatócitos na reposição de células lesadas em função da multiplicação celular (Gul et al., 2004). No trabalho realizado por Oliveira Ribeiro et al. (2002), observações qualitativas por microscopia de luz, demonstraram diminuição no diâmetro dos núcleos de hepatócitos na espécie *A. bimaculatus* com alimentação controlada associada à exposição ao tóxico tributiltin. Este tipo de alteração é um indicativo de processo degenerativo celular, uma vez que inicia com a condensação e redução do diâmetro do núcleo (Oliveira Ribeiro et al., 2002). No presente estudo, as alterações nos diâmetros de núcleo de hepatócitos demonstraram que o Thiodan[®] pode comprometer as funções hepáticas das fêmeas.

A hipertrofia dos hepatócitos também pode ser causada por contaminantes (Arnold et al., 1985), por mudanças estruturais do hepatócito relacionadas ao funcionamento da célula (Hinton et al., 1992), condições fisiológicas ligadas à reprodução (Wester et al., 2003), e pela maior atividade metabólica (Takashima & Hibiya, 1995). Portanto, o aumento do diâmetro citoplasmático nos experimentos sem

adaptação/sem alimentação e no experimento com adaptação/sem alimentação, mesmo não apresentando característica de hipertrofia morfológica evidente, mas morfométrica, sugere indícios de maior metabolização pelos hepatócitos nestes grupos experimentais. As alterações dos diâmetros de citoplasmas dos hepatócitos nos experimentos demonstraram que o Thiodan[®] pode comprometer as funções hepáticas.

Na quantificação de núcleos e citoplasmas de hepatócitos nos diferentes experimentos foram observados indícios de proliferação de hepatócitos que pode ser indicativo da ação tóxica dos hepatócitos contra detoxificação do Thiodan[®], assim como observado no trabalho por Gul et al. (2004). O percentual do tecido hepático ocupado por células do tipo hepatócito variou entre 87,42% a 90,88% na constituição do parênquima hepático de *A. bimaculatus*. Poucos trabalhos citam a constituição celular em fígados de peixes, sendo 84,5% a 87,3% de hepatócitos ocupando o parênquima hepático na truta (Hampton et al., 1989) e 89,9% no peixe Golden (Rocha et al., 1997). Estes valores demonstram que a maior parte das células dos fígados nas fêmeas de *A. bimaculatus* são hepatócitos, como descrito em outras espécies de peixes.

O aumento da quantidade de macrófagos na concentração 1,15µg/L⁻¹ dos experimentos foi superior quando comparado aos demais grupos, sugerindo que essa mobilização pode estar ajudando na detoxicação do fígado (Herraez et al., 1986). Assim, a presença de maior quantidade de macrófagos e sinusoides podem ser consideradas indicadoras de estresse em peixes, decorrentes da presença de agentes químicos (Anderson & Zeeman, 1995; Rabitto et al., 2005). Essas células são observadas frequentemente nas regiões próximas aos sinusoides e desprovidas de pigmentação. Foram observados macrófagos em trutas *Oncorhynchus mykiss* e *Salmo trutta fario* na proporção de 0,2% e 0,7%, respectivamente (Hampton et al., 1985; Rocha et al., 1997) enquanto no presente estudo variou entre 0,21% a 0,29%. Meseguer et al. (1994) observaram macrófagos livres abundantes no parênquima do fígado, sugerindo que estes se movem livremente dentro do parênquima, formando os agregados macrofágicos quando há um aumento na atividade fagocítica como resposta imune a lesões em indivíduos expostos a contaminantes. Entretanto, no presente estudo, não foram observadas estas características.

Ainda vale ressaltar que esse tóxico potencializa sua ação em temperaturas mais elevadas, como aquelas observadas no experimento sem aclimatação/sem alimentação. Estudando o efeito dos ciclodienos, Correa et al. (2001), Coutinho et al. (2005) e Capkin et al. (2006) relataram que as alterações são diretamente proporcionais à

temperatura da água, ou seja, quanto mais alta a temperatura, mais tóxicos os produtos se tornam. O experimento sem aclimatação/sem alimentação na concentração de $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$ registrou temperatura média da água em $26,9^{\circ}\text{C}$, superior aos demais experimentos. Devido a isso, uma resposta comum na intoxicação em fígados de peixes, é a diminuição das reservas de glicogênio hepático (Seinen et al., 1981; Ferguson, 1989; Cyrino et al., 2000) e índice hepatossomático (Wester et al., 1987; Wester et al., 1988; Wester et al., 2003; Glover et al., 2007), evidenciada no presente estudo.

No presente estudo percebeu-se que a ação do Thiodan[®] em concentrações subletais não afetou o fígado como um todo, mas na forma de focos no parênquima hepático nos diferentes experimentos. Este tipo de lesão pode estar associado à concentração do tóxico utilizado, tempo de exposição e a via de contaminação. A ventilação branquial acelerada e a não procura por alimentos nas primeiras 24 horas observadas nos diferentes experimentos, sugere que a entrada de água pela via branquial foi a causa mais direta da absorção e difusão do tóxico para corrente sanguínea até chegar ao fígado. No entanto, a via epidérmica também poder ser considerada via de entrada do tóxico para os tecidos (Mckim et al., 1999).

As alterações observadas nos fígados podem afetar diretamente o metabolismo das fêmeas, causando diminuição da capacidade física e tornar os peixes uma presa fácil para seus predadores. Neste sentido, os peixes poderão ter menor sucesso reprodutivo e se tornarem menos competitivos pelo alimento. Do ponto de vista ecológico, isso pode acarretar alterações na população e na cadeia alimentar (Rodrigues & Fanta, 1998).

Nas condições que o estudo foi realizado, como as concentrações do inseticida Thiodan[®] que foram utilizadas, o período de exposição e a espécie de estudo, conclui-se que as fêmeas podem estar em um processo inicial de intoxicação, um processo patológico de recuperação reversível.

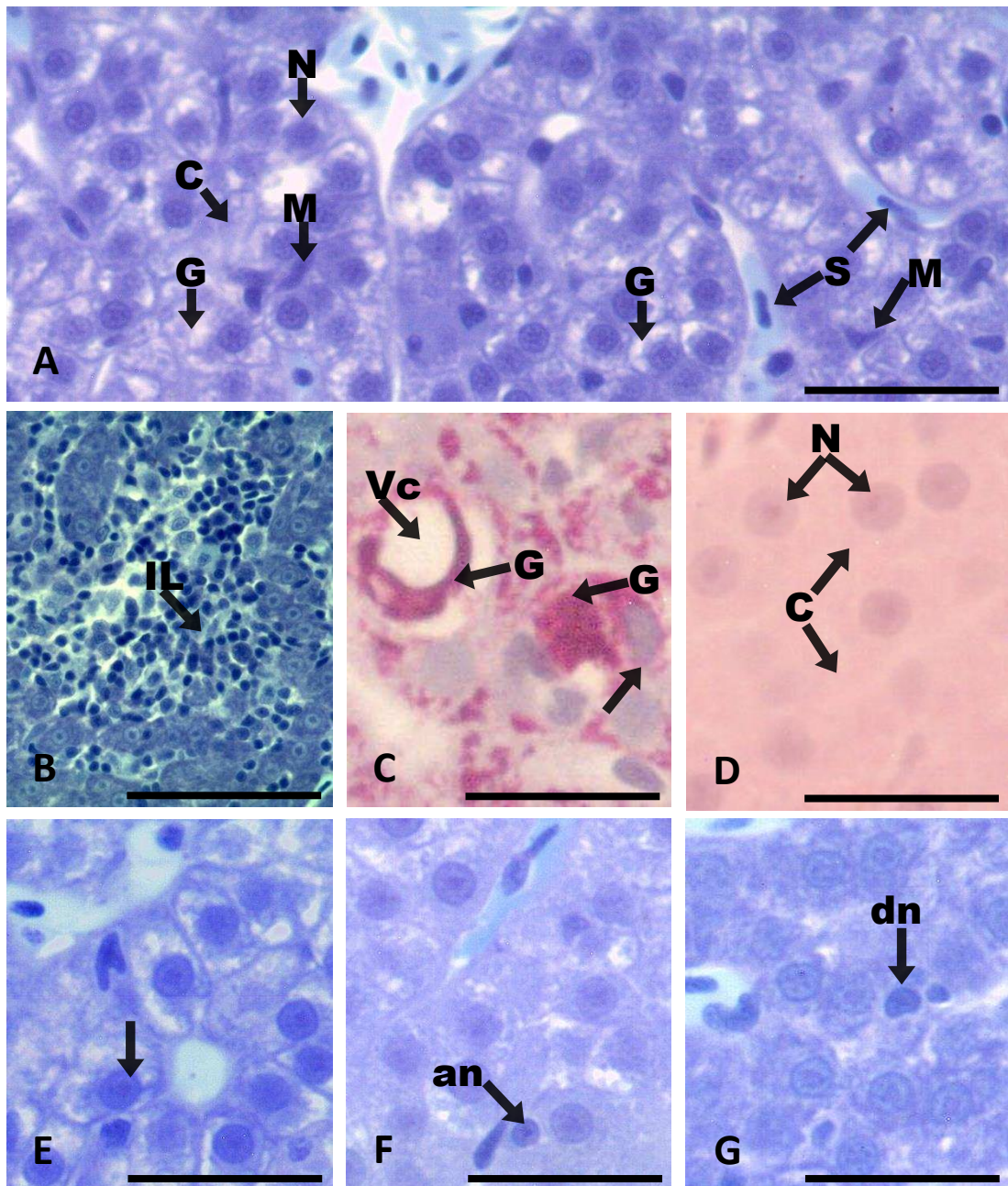


Figura 1. A: Organização histológica do tecido hepático normal de *A. bimaculatus*. B: Infiltrado leucocitário (IL) no tecido hepático de *A. bimaculatus*. C: Hepatócito com vesícula clara (Vc) envolvida por glicogênio (G) marcado positivamente pela reação de PAS e núcleo (seta) deslocado na periferia da célula no experimento sem aclimação/com alimentação na concentração $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$. D: Hepatócito com ausência de glicogênio evidenciada pela reação negativa de PAS no experimento sem aclimação/sem alimentação na concentração $5,6\mu\text{g/L}^{-1}$. **Alterações de estágio I** - E: Hepatócito com núcleo (seta) na periferia. F: Atrofia nuclear (an). G: Deformação nuclear (dn). Núcleo (N) e citoplasma (C) do hepatócito, sinusóide (S), capilar (P) com hemácias no interior, acúmulo de glicogênio (G) no citoplasma, e macrófagos (M). Barras: A (30); B (65 μm); C e D (20 μm); E, F e G (28 μm). **Coloração:** Azul de tolúidina em A-B e E-G, e PAS em C e D.

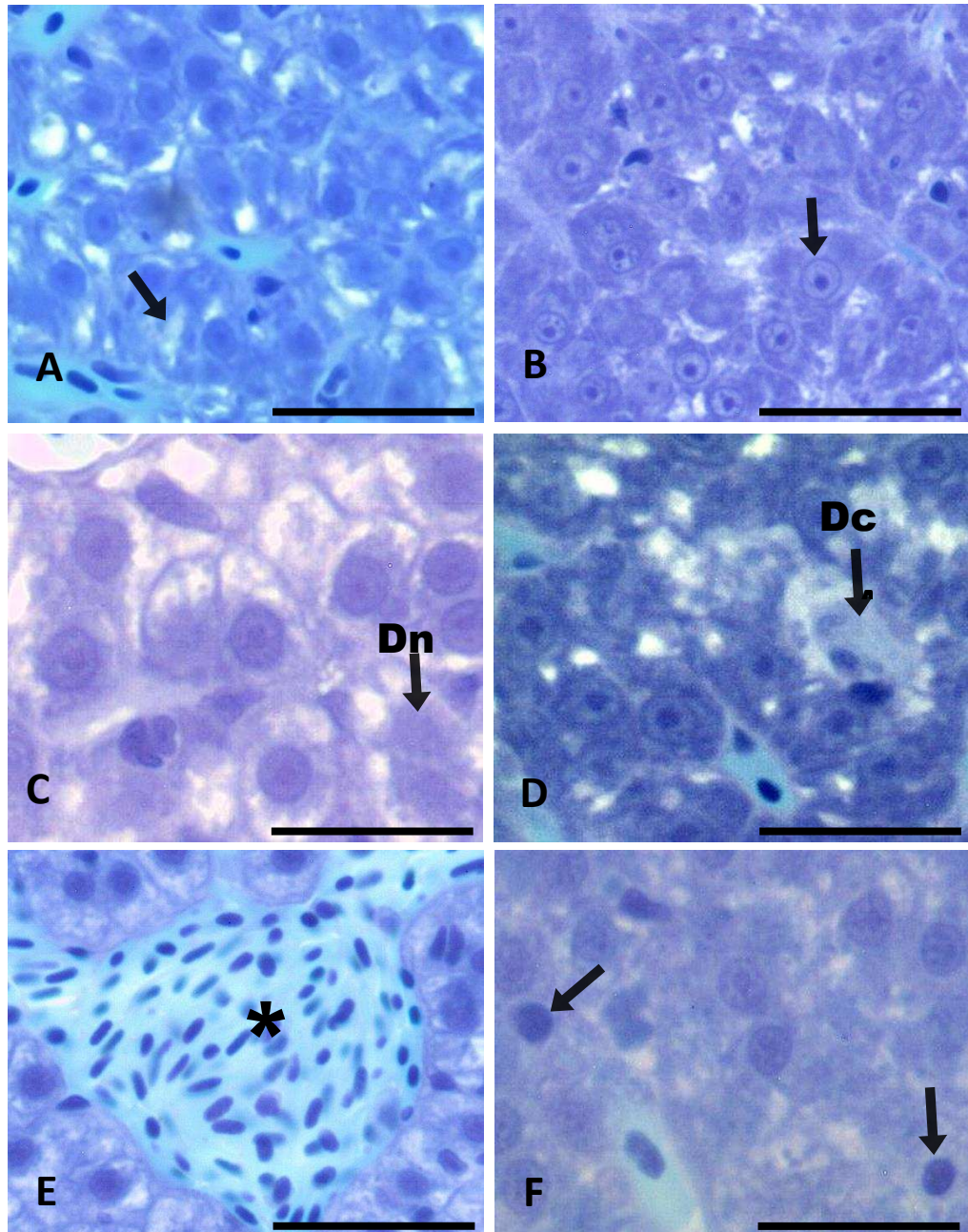


Figura 2. Alterações histológicas do tecido hepático de *A. bimaculatus*. **Alterações de estágio I**-**A:** Hipertrofia celular (**seta**). **B:** Hipertrofia nuclear (**seta**). **Alterações de estágio II** - **C:** Degeneração nuclear (**Dn**). **D:** Degeneração citoplasmática (**Dc**). **E:** Hiperemia (*). **F:** Presença de núcleos picnóticos (**setas**). **Barras:** A, B e E (30 μm); C, D e F (25 μm). **Coloração:** Azul de tolúidina.

Tabela 2. Valores médios das temperaturas durante a realização dos experimentos.

Tratamento	Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3	Experimento 4
Controle	26,8±1,05	25,4±0,49	24,8±0,69	25,0±0,49
1,15mg/L ⁻¹	27,1±1,04	25,6±0,59	24,7±0,45	24,5±0,40
2,3mg/L ⁻¹	26,9±1,17	25,5±0,48	24,4±0,62	24,7±0,43
5,6mg./L ⁻¹	26,9±1,18	25,4±0,48	24,4±0,63	24,7±0,38

Valores expressos como média ± desvio padrão.

Legenda: Experimento 1 - sem aclimação/sem alimentação; Experimento 2 - sem aclimação/com alimentação; Experimento 3 - com aclimação/sem alimentação; Experimento 4 - com aclimação/com alimentação.

Tabela 3. Quantificação média semiquantitativa das alterações histológicas (VMA) em fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	Controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimação sem alimentação	1,30 ± 0,20 ^a	2,10 ± 0,30 ^b	2,15 ± 0,19 ^b	2,16 ± 0,11 ^b
sem aclimação com alimentação	1,30 ± 0,12 ^a	1,90 ± 0,20 ^b	1,90 ± 0,08 ^{ab}	2,28 ± 0,56 ^b
com aclimação sem alimentação	1,25 ± 0,12 ^a	2,10 ± 0,21 ^b	2,06 ± 0,17 ^b	2,18 ± 0,27 ^b
com aclimação com alimentação	1,30 ± 0,14 ^a	2,00 ± 0,25 ^b	2,21 ± 0,35 ^b	2,28 ± 0,21 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste paramétrico de Tukey.

Tabela 4. Quantificação média semiquantitativa dos índices das alterações histológicas (IAH) em fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	Controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimação sem alimentação	8,83±10,34 ^a	18,50±10,09 ^{ab}	28,83±8,32 ^b	25,66±5,50 ^{ab}
sem aclimação com alimentação	4,33±5,57 ^a	28,83± 8,10 ^b	27,80±13,88 ^b	27,66±5,71 ^b
com aclimação sem alimentação	5,66± 5,85 ^a	26,00±7,73 ^b	25,50±10,78 ^b	27,33±9,20 ^b
com aclimação com alimentação	7,50±5,12 ^a	22,17±7,80 ^b	20,33±8,75 ^b	23,66±8,80 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste paramétrico de Duncan.

Tabela 5. Diâmetro médio (μm) de núcleos de hepatócitos em fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	Controle	1,15 $\mu\text{g/L}$	2,3 $\mu\text{g/L}$	5,6 $\mu\text{g/L}$
sem aclimação sem alimentação	4,61 \pm 0,40 ^{ac}	4,98 \pm 0,20 ^b	4,87 \pm 0,28 ^b	4,39 \pm 0,27 ^c
sem aclimação com alimentação	5,16 \pm 0,71 ^a	5,01 \pm 0,40 ^a	5,02 \pm 0,20 ^a	5,15 \pm 0,25 ^a
com aclimação sem alimentação	4,94 \pm 0,19 ^a	4,96 \pm 0,36 ^a	4,92 \pm 0,82 ^a	5,08 \pm 0,33 ^a
com aclimação com alimentação	5,61 \pm 0,44 ^{ac}	5,24 \pm 0,40 ^{bc}	5,09 \pm 0,28 ^b	5,33 \pm 0,19 ^c

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos do mesmo experimento. Teste paramétrico de Tukey.

Tabela 6. Diâmetro médio (μm) de citoplasmas de hepatócitos de fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	Controle	1,15 $\mu\text{g/L}$	2,3 $\mu\text{g/L}$	5,6 $\mu\text{g/L}$
sem aclimação sem alimentação	8,85 \pm 0,99 ^a	10,22 \pm 1,09 ^b	9,74 \pm 0,80 ^b	10,05 \pm 1,29 ^b
sem aclimação com alimentação	10,84 \pm 1,36 ^a	9,87 \pm 1,53 ^b	9,75 \pm 0,81 ^b	9,31 \pm 0,80 ^b
com aclimação sem alimentação	9,60 \pm 0,95 ^a	10,22 \pm 0,94 ^b	10,03 \pm 1,20 ^{ab}	10,33 \pm 1,08 ^b
com aclimação com alimentação	10,86 \pm 1,30 ^{ab}	10,4 \pm 1,35 ^{bc}	10,22 \pm 1,38 ^c	10,22 \pm 1,06 ^c

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos do mesmo experimento. Teste paramétrico de Tukey.

Tabela 7. Quantificação média de núcleos de hepatócitos no tecido hepático em 100 μm^2 de área para fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	Controle	1,15 $\mu\text{g/L}$	2,3 $\mu\text{g/L}$	5,6 $\mu\text{g/L}$
sem aclimação sem alimentação	25,53 \pm 4,94 ^a	29,8 \pm 4,64 ^b	28,4 \pm 4,59 ^b	29,1 \pm 3,74 ^b
sem aclimação com alimentação	23,71 \pm 4,90 ^a	28,9 \pm 5,41 ^b	28,9 \pm 5,45 ^b	29,0 \pm 5,14 ^b
com aclimação sem alimentação	25,60 \pm 5,38 ^a	29,4 \pm 4,80 ^b	28,6 \pm 5,55 ^b	29,3 \pm 5,52 ^b
com aclimação com alimentação	27,70 \pm 5,94 ^a	31,4 \pm 10,28 ^b	34,7 \pm 6,64 ^{bc}	32,2 \pm 6,54 ^c

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença ($P < 0,05$) entre os grupos do mesmo experimento. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 8. Quantificação média de citoplasmas no tecido hepático em 100µm² de área para fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	Controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimatação sem alimentação	395,51 ± 10,56 ^a	396,66 ± 8,77 ^a	393,60 ± 15,26 ^a	400,80 ± 7,27 ^a
sem aclimatação com alimentação	399,96 ± 13,07 ^a	398,30 ± 7,22 ^a	396,18 ± 11,43 ^{ab}	388,65 ± 19,54 ^b
com aclimatação sem alimentação	396,03 ± 17,55 ^a	390,11 ± 16,20 ^b	394,45 ± 13,88 ^{ab}	392,05 ± 22,12 ^{ab}
com aclimatação com alimentação	393,81 ± 30,25 ^a	385,55 ± 27,23 ^b	390,36 ± 22,75 ^{ab}	391,36 ± 18,92 ^b

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 9. Quantificação média de macrófagos no tecido hepático em 100µm² de área para fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimatação sem alimentação	1,20 ± 1,13 ^a	1,25 ± 0,89 ^a	1,01 ± 1,00 ^a	1,06 ± 0,94 ^a
sem aclimatação com alimentação	1,01 ± 1,01 ^a	1,24 ± 0,79 ^a	1,02 ± 0,84 ^a	1,31 ± 0,92 ^a
com aclimatação sem alimentação	0,98 ± 0,89 ^a	1,28 ± 0,97 ^a	1,15 ± 0,95 ^a	0,96 ± 0,90 ^a
com aclimatação com alimentação	1,01 ± 0,94 ^a	1,28 ± 1,09 ^a	0,86 ± 0,79 ^a	1,01 ± 0,79 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 10. Quantificação média de vasos sanguíneos no tecido hepático em 100µm² de área para fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimatação sem alimentação	18,75 ± 2,39 ^a	13,3 ± 3,46 ^a	17,96 ± 12,10 ^a	11,03 ± 4,65 ^a
sem aclimatação com alimentação	16,03 ± 7,84 ^{ab}	12,60 ± 5,32 ^a	14,09 ± 6,31 ^{ab}	22,03 ± 6,85 ^b
com aclimatação sem alimentação	18,30 ± 5,79 ^a	20,36 ± 7,73 ^a	16,81 ± 5,60 ^a	18,65 ± 9,64 ^a
com aclimatação com alimentação	18,50 ± 14,00 ^a	18,31 ± 13,26 ^a	15,10 ± 7,74 ^a	16,45 ± 7,39 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 11. Quantificação média semiquantitativa de glicogênio nos hepatócitos de fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* dos grupos controles e expostos ao Thiodan® nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimatação sem alimentação	1,33 ± 0,51 ^{ab}	2,66 ± 0,81 ^a	3,00 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,10 ^b
sem aclimatação com alimentação	1,33 ± 0,51 ^a	1,80 ± 1,09 ^a	2,00 ± 1,09 ^a	2,33 ± 1,03 ^a
com aclimatação sem alimentação	2,16 ± 0,98 ^a	1,16 ± 0,40 ^a	2,16 ± 0,98 ^a	2,33 ± 1,03 ^a
com aclimatação com alimentação	2,66 ± 0,81 ^a	2,33 ± 1,03 ^a	2,33 ± 1,03 ^a	2,16 ± 0,98 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Tabela 12. Índice hepatossomático de fêmeas de lambaris *A. bimaculatus* nos grupos controles e grupos expostos ao Thiodan® nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15µg/L	2,3µg/L	5,6µg/L
sem aclimatação sem alimentação	0,70 ± 0,14 ^{ab}	0,88 ± 0,3 ^a	0,84 ± 0,38 ^a	0,38 ± 0,31 ^b
sem aclimatação com alimentação	1,13 ± 0,54 ^a	1,04 ± 0,61 ^a	1,02 ± 0,50 ^a	1,02 ± 0,51 ^a
com aclimatação sem alimentação	0,66 ± 0,29 ^a	0,73 ± 0,20 ^a	0,92 ± 0,17 ^a	0,91 ± 0,12 ^a
com aclimatação com alimentação	0,74 ± 0,34 ^a	0,72 ± 0,29 ^a	0,94 ± 0,40 ^a	0,63 ± 0,18 ^a

Valores expressos como média ± desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença (P<0,05) entre os grupos do mesmo experimento. Teste paramétrico de Duncan.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes.** 2ª ed: versão corrigida 31/03/2006. p.19. 2007.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Diseases**, 26:499–509, 2003.
- AL-GHAIS, S. M. Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. **Marine Pollution Bulletin**, 74:183-186, 2013.
- ALI, S. M.; BOWES, G. W.; COHEN, D. B. **Endosulfan.** Toxic Substances Control Program, California State Water Resources Control Board (SWRCB), Sacramento, CA. Special Projects Report No. 84-7SP, 1984.
- ANDERSON, D. P.; ZEEMAN, M. G. **Immunotoxicology in fish.** In: RAND, G. M. (Editor). Fundamentals of aquatic toxicology effects: environmental fate and risk assessment. 2. ed. London: Taylor & Francis, 345-369, 1995.

- ARNOLD, H., PLUTA, H. J., BRAUNBECK, T. Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton *in vivo*: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 33:17-43, 1995.
- BALLESTEROS, M. L.; BIANCHI, G. E.; CARRANZA, M.; BISTONI, M. A. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 42(4):351-357, 2007.
- BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução e relação peso corporal/comprimento padrão de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 17: 1057-1065, 1982.
- BIAGIANTI-RISBOURG, S.; BASTIDE, J. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study. **Aquatic Toxicology**, 31, 217–29, 1995.
- BLAZER, V. S.; WOLKE, R. E.; BROWN, J.; POWELL, C. A. Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: Effect of age, sex, relative weight, season and site quantity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). **Aquatic Toxicology**, 10:199–215, 1987.
- BRAUNBECK, T.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroaniline. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 19:405-418, 1990.
- CHAKRABARTY, S.; RAJAKUMAR, A.; RAGHUVeer, K.; SRIDEVI, P.; MOHANACHARY, A.; PRATHIBHA, Y.; BASHYAM, L.; DUTTA-GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 155(3):491-497, 2012.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, 64:1793-1800, 2006.
- CENGIZ, E. İ.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of Thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health**, 36:75-85, 2001.
- CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass *Micropterus salmoides*. **Scientia Agricola**, 57(4):609-616, 2000.
- COIMBRA, A. M.; FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; REIS-HENRIQUES, M. A. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after endosulfan dietary exposure. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 89:230–236, 2007.
- CONAMA. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2007**. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em 12/07/2010.
- CORREA, C. N. D.; OLIVEIRA, J. J. V.; TORNISIELO, V. L. Avaliação do nível residual teórico e experimental de endosulfan em óleo de soja (*Glycine max.* (L) Merrill). **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. 11:137-148, 2001.
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOT, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L.H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. PESTICIDAS: mecanismos de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 15:65-72, 2005.
- ELLIS, A. E. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice *Pleuronectes platessa* L. **Journal of Fish Diseases**, 3:413–26, 1980.

- EPA. Ambient water quality criteria for endosulfan. United States Environmental Protection Agency. EPA 440/5-80-046. 154p. 1980.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. EU-MRLs Regulation EC 396/2005: regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, p.L70/1-L7016. 2002.
- FANTA, E.; RIOS F. S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A. C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, 54:119-130, 2003.
- FERGUSON, H. W. **Systemic pathology of fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts**. Iowa State University Press, Ames, IA, 263 pp. 1989.
- GINGERICH, W. H. Hepatic toxicology of fishes. In: **Aquatic Toxicology**, Weber, L. J., Ed., New York: Raven Press. p. 55-105, 1982.
- GLOVER C. N.; PETRI, D.; TOLLEFSEN, K. E.; JØRUM, N.; HANDY, R. D.; BERNTSSEN, M. H. Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. **Aquatic Toxicology**, 84(3):346-355, 2007.
- GUL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, New York, 30:605-609, 2004.
- HAHN, M. E.; STEGEMAN, J. J. Regulation of cytochrome P4501A1 in tTeleosts: sustained induction of CYP1A1 mRNA, protein, and catalytic activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran in the marine fish *Stenotomus chrysops*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 127(2):187-198, 1994.
- HAMPTON, J. A.; LANTZ, R. C. Functional units in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson) liver. III. Morphometric analysis of parenchyma, stroma, and component cell types. **American Journal of Anatomy**, 185(1):58-73, 1989.
- HANDY, R. D.; SIMS, D. W.; GILES, A.; CAMPBELL, H. A.; MUSONDA, M. M. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. **Aquatic Toxicology**, 47:23-41, 1999.
- HARTLEY, W. R.; THIYAGARAJAH, A.; TREINIES, A. M. Liver lesions in the gar fish (Lepisosteidae) as biomarkers of exposure. **Marine Environmental Research**, 42(5):217-221, 1996.
- HENRY, L. KISHIMBA, M. A. Pesticide residues in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile Perch (*Lates niloticus*) from Southern Lake Victoria, Tanzania, **Environmental Pollution**, 140:348–354, 2006.
- HERNAN DA CUÑA, H.; VAZQUEZ, R. G.; PIOL, N. M.; GUERRERO, V. N.; MAGGESE, M. C.; LO NOSTRO. L. F. Assessment of the acute toxicity of the organochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74:1065–1073, 2011.
- HERRAEZ, M. P.; ZAPATA, A. G. Structure and function of the melanomacrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 12:17-26, 1986.
- HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELANO, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. In: HUGGETT, R. J.; KIMERLE, R. A.; MEHRLE, P. M.; BERGMAN, H. L. (Eds.). **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, cap. 4, p. 155-209, 1992.

- HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Interactive histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMAS, S. M. **Biological indicators of stress in fish**. 8th American Fisheries Society Symposium, 1990.
- HINTON, D. E.; SEGNER, H.; BRAUNBECK, T. Toxic responses of the liver. In: (In: D., Schlenkand W. H. Benson, eds.). **Target organ toxicity in Marine and Freshwater Teleosts**. London: Taylor & Francis. 224–68, 2001.
- LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 147:222-231, 2008.
- LORENZANA, R. M.; HEDSTROM, O. R.; GALLAGHER, J. A.; BUHLER, D. R. Cytochrome p450 isozyme distribution in normal and tumor bearing hepatic tissue from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Experimental and Molecular Pathology**, 50:348-361, 1989.
- LUMLERTDACHA, S.; LOVELL, R. T.; SHELBY, R. A.; LENZ, S. D.; KEMPPAINEN, B.W. Growth, hematology and histopathology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, fed toxins from *Fusarium moniliforme*. **Aquaculture**, 130:201-18, 1995.
- MCKIM, J. M.; NICHOLS, J. W.; LIEN, G. J.; HOFFMAN, A. D.; GALLINAT, C. A.; STOKES, G. N. Dermal absorption of three waterborne chloroethanes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Fundamental and Applied Toxicology**, 31(2):218-28, 1996.
- MESEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell and Tissue Research**, 277:1-10, 1994.
- METCALFE, C. D. Toxicopathic responses to organic compounds. In: **Fish diseases and disorders**, Volume 2: Non-infectious Disorders. (J. F. Leatherland and P. T. K. Woo, eds.), CABI Publishing, Oxon, UK. 133-162, 1998.
- MICHALANY, J. **Técnica histológica em Anatomia Patológica, com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico**. São Paulo, EPU, 277 p., 1980.
- MOLINA, D. **Anvisa baixa resolução proibindo agrotóxico endossulfan a partir de 2013**. Disponível em: <http://amarnatureza.org.br/site/anvisa-baixa-resolucao-proibindo-agrotoxico-endossulfan-a-partir-de-2013,67995/>. Acessado em: 20/12/2010.
- MUSANHI, R. G. **Influence of two organochloride pesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii***. United nations development program food and agriculture organization of the United Nations. (FAO). Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research. Fevereiro de 1987.
- OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; SILVA, P. H., PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 51:161-167, 2002.
- PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Biotransformation, genotoxic and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 53:331-347, 2002.
- PEREIRA, V. M.; BORTOLOTO, J. W.; KIST L. W.; AZEVEDO, M. B.; FRITSCH, R. S.; OLIVEIRA, R. D. A. L.; PEREIRA, T. C.; BONAN, C. D.; VIANNA, M. R.; BOGO, M. R. Endossulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology**, 33(3):469-75, 2012.
- POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDZIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 339-352, 1994.

- RODRIGUES, E. L.; FANTA, E. Liver histopathology of the fish *brachydanio rerio* hamilton-buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate dimethoate 500. **Revista Brasileira de Zoologia**, 15:441-450, 1998.
- RABITTO, I. S.; ALVES COSTA, J. R. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M.; ANJOS, A.; RANDI, M. A. F.; OLIVEIRA RIBEIRO C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:147-156, 2005.
- RIBEIRO, V. M. A.; BAZZOLI, N.; MARIA, T. A.; SANTOS, G. B. Ultrastructural changes in female hepatocytes during ovarian maturation of *Steindachnerina inculpta* (Pisces: Curimatidae). **Brazilian Journal of Biology**, 66:957-962, 2006.
- ROCHA, E.; MONTEIRO, R. A. F.; PEREIRA, C. A. Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. **The Anatomical Record**, 247:317-328, 1997.
- SANTOS, J. D.; VANZETTO, G. V.; GHISI, N. C.; PRIOLI, A. J.; OLIVEIRA, E. C. Histopatologia de fígado de *Astyanax* aff. *paranae* (pisces) como indicador de contaminação ambiental em corpos hídricos do centro-noroeste do paraná. **Simpósio Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. Campo Mourão. PR, 2013.
- SCHWAIGER, J.; WANKE, R.; ADAM, S.; PAWERT, M.; HONNEN, W.; TRIEBSKORN, R. The use of histopathological indicators to evaluate contaminant related stress in fish. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 6:75-86, 1997.
- SEINEN, W.; HELDER, T.; VERNIJ, H.; PENNINKS, A.; LEEUWANGH, P. Shortterm toxicity of tri-n-butyltin chloride in rainbow trout, (*Salmo gairdneri* Richardson) yolk sac fry. **Science of the Total Environment**, 19:155-166, 1981.
- SENTHILKUMARAN, B.; YOSHIKUNI, M.; NAGAYAMA, Y. A shift in steroidogenesis occurring in ovarian follicles prior to oocyte maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 215:11-18, 2004.
- SILVA BARNI, M. F.; GONZALEZ, M.; MIGLIORANZA, K. S. Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 99:45-53, 2014.
- SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. In press. Biochemical, physiological, and histological changes in the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. doi: 10.1016/j. ecoenv. 01.012, 2007.
- STEGEMAN, J. J., LECH, J. J. Cytochrom p-450 monoxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, 90:93-100, 1991.
- STEPHEN, C.; KENT, M. L.; DAWE, S. C. Hepatic megalocytosis in wild and farmed chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* in British Columbia, Canada. **Diseases of Aquatic Organisms**, 16:35-39, 1993.
- STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 23p., (Report B 81/86), 1986.
- TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: Normal and pathological features**. 2^a ed. Tokio, 1995.
- THIYAGARAJAH, A.; GRIZZLE, J. M. Pathology of diethylnitrosamine toxicity in the fish *Rivulus marmoratus*. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**. 6:219-3, 1985.

- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. The fate organic pollutants in individuals and in ecosystems. In: **Principles of ecotoxicology** (C.H. Walker et al.). Taylor & Francis, London, 67-76, 1996.
- WESTER, P. W.; CANTON, J. H.; VAN IERSEL, A. A. J.; KRANJNC, E. I.; VAESSEN, H. A. M. G. The toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) and di-*n*-butyltindichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). In: **Toxicological pathology in fish: An evaluation with two species and various environmental contaminants**. Door, The Netherlands. 107–128, 1988.
- WESTER, P. W.; CANTON, J. H. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long term exposure to bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) and di-*n*-butyltindichloride (DBTC). **Aquatic Toxicology**, 10:143-65, 1987.
- WESTER, P. W.; VAN DER VEN, L. T. M.; BRANDHOF, E. J.; AND VOS, J. H. **Identification of endocrine disruptive effects in the aquatic environment: a partial life cycle assay in zebrafish**. RIVM Report 6409200001/2003, 31-9, 2003.
- WOLF, J. C.; WOLFE, M. J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. **Toxicologic Pathology Review**, 33(1):75-85, 2005;
- WOLKE, R. E. Piscine macrophage aggregates, a review. **Annual Review of Fish Diseases**, 2:91-108, 1992.

5.2. CAPÍTULO 2

EFEITOS DO INSETICIDA THIODAN[®] SOBRE A MORFOLOGIA DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM LAMBARIS *Astyanax bimaculatus*

RESUMO

O Thiodan[®] é um tóxico que pode causar alterações morfológicas nos tecidos de peixes expostos, dependendo da concentração. A fim de investigar possíveis alterações, este estudo avaliou a morfologia ovariana de lambaris *Astyanax bimaculatus* expostos ao Thiodan[®] (endossulfan 350g/L) por 96 horas em quatro diferentes experimentos com três concentrações subletais: 1,15; 2,3 e 5,6 µg/L. As fêmeas expostas ao Thiodan[®] foram divididas em quatro experimentos: sem aclimação e sem alimentação; sem aclimação e alimentados; com aclimação de 10 dias e sem alimentação; e com aclimação de 10 dias e alimentados. No presente estudo percebeu-se que a ação do Thiodan[®] em concentrações subletais não afetou a morfologia do desenvolvimento folicular. Porém, os experimentos com aclimação demonstraram quantidades inferiores de folículos primários e secundários quando comparados aos peixes dos experimentos sem aclimação. Houve maior quantidade de folículos atresícos nos grupos expostos ao Thiodan[®] em relação ao grupo controle. O diâmetro folicular nos folículos secundários dos peixes expostos ao Thiodan[®] no experimento com adaptação/com alimentação foi maior em relação ao grupo controle. Além disso, as médias dos índices gonadossomático (IGS) e hepatossomático (IHS) dos experimentos com aclimação foram inferiores aos experimentos sem aclimação. Esses dados sugerem que o eixo hipotálamo-hipófise-ovário pode estar sendo afetado pelo ambiente ao qual o peixe foi submetido, podendo causar comprometimento na fisiologia do desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: histopatologia, ovário, peixe, contaminação aquática.

1. INTRODUÇÃO

O Thiodan[®] é um inseticida de uso comercial que consiste na mistura de dois isômeros ativos, sendo 70% α -endosulfan e 30% β -endosulfan. Endosulfan é um hidrocarboneto clorado usado como inseticida de amplo espectro, que controla insetos por ação de contato e ingestão (Stumpf & abhaver, 1986; Chakrabarty et al., 2012). Atualmente, foi banido em vários países pela sua alta toxicidade (Molina, 2010). O tóxico pode chegar ao meio aquático pelo escoamento superficial e infiltração no solo por meio da irrigação agrícola e das chuvas, colocando em riscos os organismos que ali residem (Walker et al., 1996; Capkin et al., 2006; Glover et al., 2007). Conseqüentemente, o endosulfan pode acumular nos tecidos destes organismos, como já observado por Henry & Kishimba (2006) na espécie de peixe *Oreochromis niloticus*. No entanto, a União Européia estabelece como limite máximo de endosulfan em gordura, valores de 0,05mg/kg⁻¹ (EPA 2002), e para água doce, 0,22 μ g/L⁻¹ (EPA 1980). A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente, levando em consideração a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA - nº 357/2005, estabelece o valor limite de 0,056 μ g/L de resíduo do referido inseticida e seus metabólitos nas águas doces de classe 1.

Muitos inseticidas apresentam baixa toxicidade antes de serem transformados em substâncias tóxicas metabolicamente ativas. O sulfato de endosulfan é um dos produtos derivados do metabolismo do endosulfan, sendo considerado o principal metabólito devido à sua importância toxicológica, por ser mais estável no meio ambiente do que em sua fórmula original (Ali et al., 1984). A sensibilidade ao endosulfan em organismos aquáticos tem sido descrita na literatura (Capkin et al., 2006; Ballesteros et al., 2007; Pereira et al., 2012). O produto é extremamente tóxico para os peixes e outros organismos aquáticos, mesmo em concentrações muito pequenas (Cengiz et al., 2001), como verificado também por Ballesteros et al. (2007) com peixes adultos da espécie *Jenynsia multidentata* sob o efeito do endosulfan por 96 horas, utilizando concentrações de 0,72 μ g/L e 1,31 μ g/L em machos e fêmeas, respectivamente.

Em peixes, o desenvolvimento folicular tem sido descrito por vários pesquisadores (Begovac & Wallace, 1988; Bazzoli & Rizzo, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Grier, 2000, 2002 e 2007) e, como nos animais em geral, compreende os períodos pré-meiótico, perinucleolar, vitelogênico e maturação final. Estas fases ocorrem no

interior de folículos, cuja parede é constituída por zona radiata, camada folicular, membrana basal e teca (Grier, 2000), e que desempenham importante papel durante a ovogênese e fertilização. Quando a qualidade da água é alterada devido a xenobióticos, a gametogênese pode ser alterada comprometendo a fertilização e a qualidade do ovo (Chatterjee et. al., 1997). Assim, os peixes quando expostos a inseticidas podem apresentar alterações morfológicas significativas no ovário.

Alguns trabalhos mostram diversas alterações provocadas nos folículos por contaminantes, como por exemplo, retração citoplasmática, degeneração citoplasmática, adesão folicular, aparecimento de folículos anucleados, necrose e alteração no diâmetro dos folículos (Hazarika & Das, 1998; Dutta et al., 2003; Maxwell & Dutta, 2005). Além disso, pode ocorrer a atresia folicular, que é um processo frequentemente observado nos ovários dos vertebrados (Saidapur, 1978), sendo causada por diversos fatores como agrotóxicos, temperatura, luz, alimentação inadequada e confinamento (Nagahama, 1983; Guraya, 1986). Outro fator importante é a concentração hormonal que pode interferir na síntese de vitelogenina e causar efeitos negativos associados com a quantidade de folículos pré-vitelogênicos e vitelogênicos durante o desenvolvimento folicular (Chatterjee et. al., 1997). No entanto, alterações no estado de saúde provocadas por concentrações de contaminantes que não matam os peixes em curto prazo, e que podem ser consideradas seguras, podem sugerir consequências na reprodução e interferência na cadeia alimentar. Esse tipo de estudo é de grande importância para se avaliar impactos provocados por diferentes tratamentos sobre o desenvolvimento de folículos que poderiam interferir na reprodução de peixes.

O lambari *Astyanax bimaculatus* foi escolhido como organismo experimental, pois é representativo no ecossistema, sendo encontrado desde Nordeste brasileiro até a bacia do rio da Prata na Argentina (Barbieri et al., 1982). É um peixe de pequeno porte e de fácil manutenção em laboratório.

Este estudo teve como objetivo analisar as alterações morfológicas nos diferentes estádios do desenvolvimento folicular em ensaios subletais com o tóxico Thiodan[®].

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária, onde foram realizados o teste subletal e as atividades de coleta. As etapas de fixação e inclusão dos fragmentos dos ovários, microtomia, coloração de lâminas histológicas, e as análises histológicas e morfométricas foram realizadas nos Laboratórios de Biologia de Peixes e de Histopatologia do Departamento de Veterinária da UFV.

2.1. Animais

Foram utilizadas fêmeas de *A. bimaculatus* obtidas de tanques de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG. Para o presente estudo, foram selecionadas fêmeas de lambari em maturação avançada com peso de $11,52 \pm 2,0$ g e comprimento total de $9,12 \pm 0,64$ cm. As características para a escolha dos animais em maturação avançada se basearam em aspectos corporais, como ventre abaulado, e poro genital dilatado e vascularizado.

Os peixes foram transportados para o Biotério de Peixes do DVT/UFV, e mantidos em aquários com capacidade de 50 litros numa densidade de 0,5g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, temperatura controlada e monitoramento duas vezes ao dia. Todos os aquários possuíam um sistema de filtração (250L/h) e aeração contínua de água para garantir o bem-estar dos peixes. Os peixes foram alimentados com ração comercial Purina contendo 35% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo da piscicultura.

As características da água utilizada no teste em sistema estático foram mantidas de acordo com as recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2007), com temperaturas de $25,5 \pm 1,0$ °C, livre de cloro, pH $7,2 \pm 0,3$; oxigênio dissolvido $6,9 \pm 0,6$ mg/L⁻¹ e dureza total (CaCO₃) $28,15 \pm 5,94$ mg/L⁻¹.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (protocolo 24/2009). O médico veterinário responsável foi o Doutor Laércio dos Anjos Benjamin (CRMV-MG 3387).

2.2. Agrotóxico

Para a avaliação proposta no presente trabalho, foi utilizado o inseticida organoclorado Thiodan[®] (Bayer) em sua apresentação comercial com 350g/L⁻¹ de endosulfan.

2.3. Teste de toxicidade subletal em sistema estático

O teste de toxicidade subletal com o endosulfan foi realizado utilizando-se 120 lambaris, tendo por base as normas técnicas para teste em sistema estático (NBR 15088 - ABNT, 2007).

As fêmeas foram expostas ao Thiodan[®] (endosulfan 350g/L) por 96 horas em quatro diferentes experimentos: sem aclimação e sem alimentação; sem aclimação e com alimentação; com aclimação de 10 dias e sem alimentação; e com aclimação de 10 dias e com alimentação. Foram utilizadas três concentrações do Thiodan[®] inferiores à CL₅₀ pré-determinada (13,7µg/L) em laboratório de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007). As concentrações utilizadas em cada experimento foram de 1,15; 2,3 e 5,6µg/L⁻¹, além de um grupo controle sem tóxico, com três repetições nas mesmas condições para cada concentração.

2.4. Análises morfológicas e morfométricas

Após 96 horas de experimento foram coletados 96 peixes, sendo seis animais de cada grupo nos diferentes experimentos. Os ovários foram coletados após os peixes terem sido anestesiados com benzocaína (1:10.000) e eutanasiados pela secção transversal da coluna vertebral na região do opérculo.

Para a histologia, os ovários foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2 por 24 horas e incluídos em resina glicolmetacrilato (Leica, Historesin). Em seguida, secções 3µm de espessura foram coradas utilizando hematoxilina/eosina para análises morfológicas e morfométricas. As lâminas foram montadas com Entellan (Merck[®]), analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus e as imagens foram obtidas com câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus.

Para os estudos morfológicos foram analisadas lâminas de seis animais por concentração. As secções histológicas foram analisadas em toda sua extensão em busca de alterações morfológicas foliculares (Tabela 1) que pudessem ser representativas da

ação do Thiodan[®] no tecido ovariano, sempre comparando estas alterações com o padrão de organização dos ovários das lâminas dos grupos controles.

Para a avaliação morfométrica, foram realizadas contagens dos diferentes estádios de desenvolvimento folicular. Para isto, foram fotografados ao acaso 10 campos com objetiva de 10X (cada campo com 509,4 µm de largura por 681,2 µm de comprimento, totalizando uma área de 347 mm²). As contagens foram realizadas em 10 campos escolhidos ao acaso para cada animal nos quatro experimentos. Além disso, foi realizada a contagem de folículos atrésicos e observados eosinófilos associados aos folículos vitelogênicos, utilizando o microscópio com objetiva de 40X em 10 folículos escolhidos ao acaso para cada animal nos quatro tratamentos experimentais. Também foram realizadas medições de diâmetros em 10 folículos vitelogênicos para cada animal. Foram escolhidos folículos o mais esféricos possível com corte passando pelo núcleo. Estas medidas foram obtidas por meio do programa Image-Pro Plus traçando-se duas linhas perpendiculares sobre núcleo, e respeitando-se os limites do folículo. Em todas as contagens e medições foram calculados os valores médios e desvios-padrão para cada concentração para se avaliar o desenvolvimento folicular nos diferentes experimentos.

Tabela 1. Alterações histológicas quanto ao comprometimento do desenvolvimento folicular (adaptado de Chatterjee et al., 1997; Dutta & Dalal, 2008).

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS FOLICULARES

Alteração nos folículos

Descolamento do revestimento folicular

Retração citoplasmática

Retração nuclear

Atresia folicular

Aglutinação nucleoplasmática

Aglutinação citoplasmática

Aglutinação dos glóbulos de vitelo

Folículos com ausência de citoplasma e núcleo

Granulócitos envolvendo folículos

2.5. Parâmetros biométricos

Foram registrados, para cada exemplar, os seguintes dados biométricos: peso corporal (PC, em g), peso dos ovários (PO, em g) e peso do fígado (PF, em g). Os valores médios e os desvios padrão dos índices gonadossomático ($IGS=PO \times 100/PC$) e

hepatossomático ($IHS=PFx100/PC$) foram calculados para cada animal, em cada um dos grupos nos diferentes experimentos.

2.6. Análises estatísticas

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão e avaliados pelo Software Statistica 7.0 por meio da análise de variância (ANOVA). Após o teste de distribuição normal, os dados foram comparados entre os grupos controle e grupos expostos ao Thiodan[®] usando análise de variância one-way, seguida do teste de Tukey ou Duncan. Quando os dados não apresentaram uma distribuição normal foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. $P<0,05$ foi utilizado como critério de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Desenvolvimento folicular

O desenvolvimento folicular de *A. bimaculatus* do presente estudo foi dividido em duas etapas: desenvolvimento primário e desenvolvimento secundário.

Para facilitar a compreensão, o desenvolvimento primário em *A. bimaculatus* foi subdividido em dois estádios: desenvolvimento primário inicial e desenvolvimento primário avançado (Figuras 1 A e B). No desenvolvimento primário inicial, os folículos apresentaram citoplasma fortemente basófilo, núcleo esférico, um ou mais nucléolos dispersos pelo nucleoplasma, e estavam envoltos por células foliculares pavimentosas (Figura 1 A). Durante o desenvolvimento primário avançado, o citoplasma do folículo torna-se menos basófilo que a etapa anterior, o núcleo é esférico, um ou mais nucléolos dispersos que estão associados ao envoltório nuclear (Figura 1 B). A camada de células foliculares é pavimentosa, com o núcleo alongado. Entre as células foliculares e o citoplasma do folículo, aparece a zona radiata como uma fina camada (Figura 1 B). Na região mais externa do folículo aparecem, associadas ao mesmo, as células da teca.

O desenvolvimento secundário em *A. bimaculatus* foi subdividido em três estádios: desenvolvimento secundário inicial, desenvolvimento intermediário e desenvolvimento avançado. No desenvolvimento secundário inicial, o volume citoplasmático aumentou mais em relação ao núcleo, e o folículo neste estágio apresentou um diâmetro maior que o estágio anterior. O núcleo é central, ligeiramente acidófilo, com nucléolos pequenos e dispersos pelo nucleoplasma. O citoplasma é

granular e fracamente basófilo, com a presença de vesículas corticais pequenas e claras na periferia do citoplasma (Figura 1 C). Em seguida ocorre um aumento no diâmetro do folículo e inicia-se a deposição de vitelo a partir da região periférica, o que permitiu classificar esse estágio como desenvolvimento secundário intermediário (Figura 1 D). No estágio de desenvolvimento secundário avançado, o volume citoplasmático aumentou mais em relação ao núcleo, tendo o folículo neste estágio, um diâmetro maior quando comparado aos estágios anteriores. Nessa etapa do desenvolvimento, o citoplasma do folículo está preenchido com glóbulos de vitelo (Figura 1 D). A maturação final é caracterizada pela formação do aparelho micropilar, zona radiata espessa e núcleo deslocado em direção ao aparelho micropilar.

Os folículos ovarianos dos lambaris apresentaram morfologia normal nas diferentes concentrações de Thiodan[®] (Figuras 1 A-D).

3.2. Atresia folicular

A atresia folicular foi caracterizada em três diferentes etapas nos ovários de *A. bimaculatus*: atresia inicial, intermediária e avançada. A atresia folicular inicial é caracterizada pela descontinuidade da zona radiata e hipertrofia das células foliculares (Figura 2 A). Nesse momento da atresia folicular, foram evidenciadas células do tipo granulócito entre a membrana basal e células da teca na maioria dos folículos observados (Figura 2 B). Na sequência do processo, atresia folicular intermediária, ocorre o início da fusão e liquefação dos glóbulos de vitelo, desintegração e fragmentação da zona radiata, hipertrofia das células foliculares que se tornam vacuolizadas e contêm material granular de aspecto similar aos glóbulos de vitelo e invasão do citoplasma pelas células foliculares (Figura 2 C). Na atresia avançada, as células foliculares absorvem os resíduos finais do folículo, levando a uma diminuição do tamanho do folículo atrésico (Figura 2 D).

3.3. Quantificação dos folículos ovarianos

A quantidade de folículos em desenvolvimento primário inicial entre as fêmeas do mesmo experimento não mostrou diferenças entre si ($P > 0,05$) (Figura 3). Quando foram comparados os diferentes experimentos nos mesmos grupos, foi registrada maior quantidade de folículos primários iniciais nas fêmeas do grupo controle do experimento com aclimação/alimentação ($P < 0,05$) em relação às fêmeas dos grupos controle dos

experimentos sem aclimação (Figura 3). Além disso, foi observada maior quantidade de folículos primários iniciais na concentração de 2,3µg/L do experimento com aclimação/com alimentação em relação ao experimento sem aclimação/com alimentação ($P<0,05$) (Figura 3).

Na contagem de folículos em desenvolvimento primário avançado entre fêmeas do mesmo experimento não houve diferenças nas médias obtidas (Figura 4). No entanto, quando comparados os mesmos grupos entre os diferentes experimentos, verificou-se que no estágio de desenvolvimento primário avançado houve maior quantidade de folículos no grupo controle do experimento com aclimação/com alimentação ($P<0,05$) em relação ao experimento com aclimação/sem alimentação, assim como no experimento sem aclimação/sem alimentação (Figura 4). Quando comparados os grupos da concentração 1,15µg/L, registrou-se maior quantidade de folículos no experimento com aclimação/sem alimentação ($P<0,05$) em relação ao experimento sem aclimação/com alimentação (Figura 4). Entre as fêmeas dos grupos da concentração 2,3µg/L foi registrada maior quantidade de folículos nos experimentos com aclimação ($P<0,05$) em relação às fêmeas dos experimentos sem aclimação (Figura 4).

Na contagem de folículos em desenvolvimento secundário inicial nas fêmeas do experimento sem aclimação/com alimentação houve maior quantidade de folículos na concentração 5,6µg/L ($P<0,05$) em relação à concentração de 1,15µg/L (Figura 5), mas não com o controle. Ao comparar as fêmeas dos diferentes experimentos dos mesmos grupos, houve maior quantidade de folículos secundários iniciais ($P<0,05$) na concentração 1,15µg/L do experimento sem aclimação/sem alimentação e experimento com aclimação/sem alimentação em relação ao experimento sem aclimação/com alimentação e experimento com aclimação/com alimentação (Figura 5).

Em relação as contagens de folículos em desenvolvimento secundário intermediário e avançado não houve diferenças entre as fêmeas ($P>0,05$) (Figuras 6 e 7).

3.4. Quantificação dos folículos atrésicos

Nas contagens de folículos atrésicos iniciais nas fêmeas de *A. bimaculatus* dos diferentes experimentos não foram constatadas diferenças ($P>0,05$) (Figura 8). As contagens de atresia total representaram as somas das contagens de atresias inicial, intermediária e avançada. As contagens de atresia total não mostraram diferenças nos

experimentos, embora o número de folículos atrésicos mostrasse tendência crescente nos grupos tratados com Thiodan[®] nos diferentes experimentos (Figura 9). Entretanto, foi observado maior número de folículos atrésicos nas fêmeas dos experimentos com aclimação de 10 dias em relação aos experimentos sem aclimação (Figura 9).

3.5. Diâmetro dos folículos em desenvolvimento secundário avançado

Os valores médios nos diâmetros dos folículos secundário avançado nas fêmeas do experimento com aclimação/com alimentação demonstraram aumento ($P < 0,05$) nas concentrações 1,15 $\mu\text{g/L}$ ($578,37 \pm 59,77 \mu\text{m}$) e 5,6 $\mu\text{g/L}$ ($573,11 \pm 61,78 \mu\text{m}$) de Thiodan[®] em relação às fêmeas do grupo controle ($516,06 \pm 57,57 \mu\text{m}$). Nos demais experimentos não foram registradas diferenças entre os folículos ($P > 0,05$), apesar de ter sido observado na maioria dos grupos essa mesma tendência de aumento do diâmetro dos folículos (Tabela 2).

3.6. Parâmetros biométricos

As fêmeas de *A. bimaculatus* dos grupos expostos ao Thiodan[®] não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) nos valores dos IGS e IHS quando comparados com os grupos controles (Tabelas 3 e 4). No entanto, as fêmeas dos experimentos com aclimação apresentaram diminuição nos valores dos IGS e IHS quando comparados aos experimentos sem aclimação (Tabelas 3 e 4).

4. DISCUSSÃO

Em peixes teleósteos o tipo de desenvolvimento folicular pode ser assincrônico, com a presença de folículos em diferentes estádios de desenvolvimento (Nagahama, 1983; Connaughton et al., 1998; Selman et al., 1986), assim como na presente espécie deste estudo. Os ovários das fêmeas de *A. bimaculatus* submetidas ao efeito do Thiodan[®] apresentaram folículos ovarianos em diferentes fases de desenvolvimento com variações na estrutura do folículo, como diâmetro, características do núcleo, camadas envoltórias, composição e distribuição do vitelo, conforme observado em outras espécies do gênero (Miranda, 1996; Miranda et al. 1999; Melo et al., 2005; Mazzoni et al., 2005; Rodrigues et al., 2005; Hernan Da Cuña et al., 2011).

Ao contrário do presente estudo, Dutta et al. (2008) ao submeterem as fêmeas da espécie *Lepomis macrochirus* a três concentrações diferentes (0,25; 0,75 e 1 $\mu\text{g/L}$) de endosulfan, observaram comprometimento do desenvolvimento folicular, com retração

nuclear e citoplasmática na menor concentração, enquanto nos folículos em maturação avançada foi observado um aspecto vazio, sem conteúdo citoplasmático na concentração de 0,75 µg/L. Além disso, na concentração de 1µg/L, os autores encontraram maior grau de deformações, com folículos vazios sem a presença de folículos, ou alterações do núcleo e perda do material nuclear, que é relatado como necrose nuclear. No trabalho conduzido por Chatterjee et al, (1997), foi avaliada a ação do carbofuram no desenvolvimento folicular na espécie *Heteropneustes fossilis*, encontrando-se degeneração citoplasmática e na camada folicular de folículos em desenvolvimento primário e secundário. Entretanto, Hernan Da Cuña et al. (2011) não observaram alterações nos ovários em peixes expostos ao endosulfan. No estudo realizado por Ballesteros et al. (2007) utilizando peixes machos e fêmeas da espécie *Jenynsia multidentata* foi verificado que o maior teor de lipídeos nas fêmeas é um fator importante para esclarecer a maior resistência contra o endosulfan, ao contrário dos machos que são mais susceptíveis neste caso. De acordo com este resultado descrito na literatura, pode-se inferir que este fator poder ter interferido na maior resistência das fêmeas de *A. bimaculatus* em período reprodutivo às concentrações de Thiodan[®] testadas.

Alguns estudos têm esclarecido a interferência de poluentes na quantidade de folículos nos diferentes estádios do desenvolvimento folicular em peixes. Os trabalhos de Chatterjee et al. (1997), Jensen et al. (2004), Dutta & Dalal (2008) e Chakrabarty et al. (2012) avaliaram os efeitos de pesticidas, encontrando maior quantidade de folículos primários no grupo tratado em relação ao grupo controle, assim como em peixes mantidos em cativeiros (Honji et al., 2009). Em outro estudo (Chatterjee et al., 2001), os pesquisadores encontraram por meio de análises histológicas da hipófise, a possibilidade do carbofuram afetar as células produtoras de GnRH do hipotálamo prejudicando o eixo hipófise-gônada e comprometendo a viabilidade no desenvolvimento folicular; já, Chakrabarty et al. (2012) verificaram, em peixes tratados com endosulfan, concentração inferior de GnRH e superior da aromatase quando comparados com o grupo controle, caracterizando que o endosulfan pode atuar como disruptor endócrino (Lemaire et al., 2006), que pode aumentar a biossíntese do estradiol para promover um rápido desenvolvimento folicular (Chakrabarty et al., 2012). Estes resultados podem ajudar a esclarecer os resultados do presente trabalho onde se observou maior quantidade de folículos primários iniciais e primários avançados nos experimentos com aclimação quando comparados com os experimentos sem

aclimação, sugerindo uma possível desregulação endócrina no eixo hipófise-gônada nos peixes aclimatados em aquários por 10 dias. Além disso, as concentrações hormonais e enzimáticas relacionadas ao desenvolvimento folicular podem estar supostamente alteradas em *A. bimaculatus*, mas são necessários estudos fisiológicos para essa provável confirmação.

O processo de atresia folicular no lambari *A. bimaculatus* foi semelhante ao descrito por Miranda et al. (1999), Munoz et al. (2002); Melo et al. (2005) e Santos et al. (2005). O processo da atresia que ocorre nos folículos secundários é do tipo hipertrófico, devido à hipertrofia e hiperplasia das células foliculares (Vizziano & Berois, 1990). No trabalho realizado por Coward & Bromage (1998) na espécie *Tilapia zilli*, foi verificado aumento de folículos atrésicos em experimento com duração entre 18 e 26 dias, assim como verificado no trabalho de Jensen et al. (2004) quando utilizaram a substância flutamida. De acordo com estes autores, isto pode reduzir a fecundidade e também influenciar na qualidade do folículo. Linares-Casenave et al. (2002) explicam que o processo de atresia está associado com desregulação das concentrações plasmáticas de estradiol, testosterona e vitelogenina. Portanto, o aumento da quantidade dos folículos atrésicos nos grupos expostos ao Thiodan[®] e a maior quantidade de atresia nos experimentos com aclimação, mesmo não apresentando diferenças estatísticas, sugerem que pode estar iniciando desregulação hormonal nestes peixes.

A presença de granulócitos associados aos folículos secundários avançados em lambari *A. bimaculatus* nos diferentes experimentos pode ser associada à reação imunológica em conjunto com as células foliculares, assim como observado por alguns autores (Drummond et al., 2000; Santos et al., 2005; Santos et al., 2008). Além disso, no trabalho realizado por Santos et al. (2008) foi detectada a presença de proliferação celular (PCNA) nas células da teca de folículos em processo de atresia, confirmando que estas células podem estar se preparando para o processo de remodelação ovariana. No entanto, essas evidências de granulócitos associados aos folículos estão de acordo com o que já foi observado em outros trabalhos, caracterizando um processo fisiológico importante na regressão folicular das fêmeas de *A. bimaculatus* expostas ao Thiodan[®].

O diâmetro dos folículos vitelogênicos é espécie-específico; porém, o Thiodan[®] alterou o diâmetro folicular no experimento com aclimação/com alimentação. Esta alteração do diâmetro, que leva os folículos vitelogênicos a atingirem a maturação, pode ser causada pelas diferenças nas concentrações de vitelogenina, estradiol e aromatase (Jensen et al., 2004; Corriero et al., 2007; Chakrabarty et al., 2012) ou a mesma sendo

ligada aos receptores específicos nos folículos (Patiño & Sullivan, 2002; Bugel et al., 2010). Bugel et al. (2010) relataram a diminuição da expressão da vitelogenina no peixe *Fundulus heteroclitus* em rio contaminado com pesticidas orgânicos persistentes, o que resultou na diminuição da quantidade de folículos vitelogênicos, enquanto Honji et al. (2009) relataram a baixa fecundidade e aumento do diâmetro dos folículos nos peixes *Salminus hilari* mantidos em cativeiro quando comparados com peixes de ambientes naturais. Contudo, é necessário estudar as vias que conduzem a esta alteração. Estes resultados mostram que diferentes vias podem afetar a reprodução dos peixes e que o Thiodan[®] pode estar agindo como desregulador endócrino nos folículos secundários avançados de *A. bimaculatus*.

O IGS e IHS podem variar entre os peixes devido às diferenças na sensibilidade frente à exposição a contaminantes, período reprodutivo e peixes mantidos em cativeiro (Chatterjee et al., 1997; Cyrino et al., 2000; Jensen et al., 2004; Honji et al., 2009). No entanto, o fato das médias dos IGS e IHS nos experimentos com aclimatação terem sido menores quando comparadas com os experimentos sem aclimatação, sugere associação entre quantidade inferior de folículos secundários e quantidade superior de atresia nos experimentos com aclimatação, assim como no trabalho de Chatterjee et al. (1997) e Bugel et al. (2010), que verificaram diminuição na taxa de folículos vitelogênicos e IGS.

A ventilação branquial acelerada e a não procura por alimentos nas primeiras 24 horas observadas nos diferentes experimentos, sugere que a entrada de água pela via branquial foi causa direta da absorção e difusão do tóxico no organismo. No entanto, a via epidérmica também poder ser considerada via de entrada do tóxico para os tecidos (Mckim et al., 1999). Portanto, a exposição dos peixes ao Thiodan[®] e a aclimatação foram fatores mais que afetaram o diâmetro e a quantidade de folículos em *A. bimaculatus*. Conforme as condições em que o estudo foi realizado, levando-se em consideração as concentrações do inseticida Thiodan[®] utilizadas, período de exposição e espécie de estudo, demonstram que as fêmeas analisadas podem estar em processo inicial de intoxicação com possível alteração fisiológica.

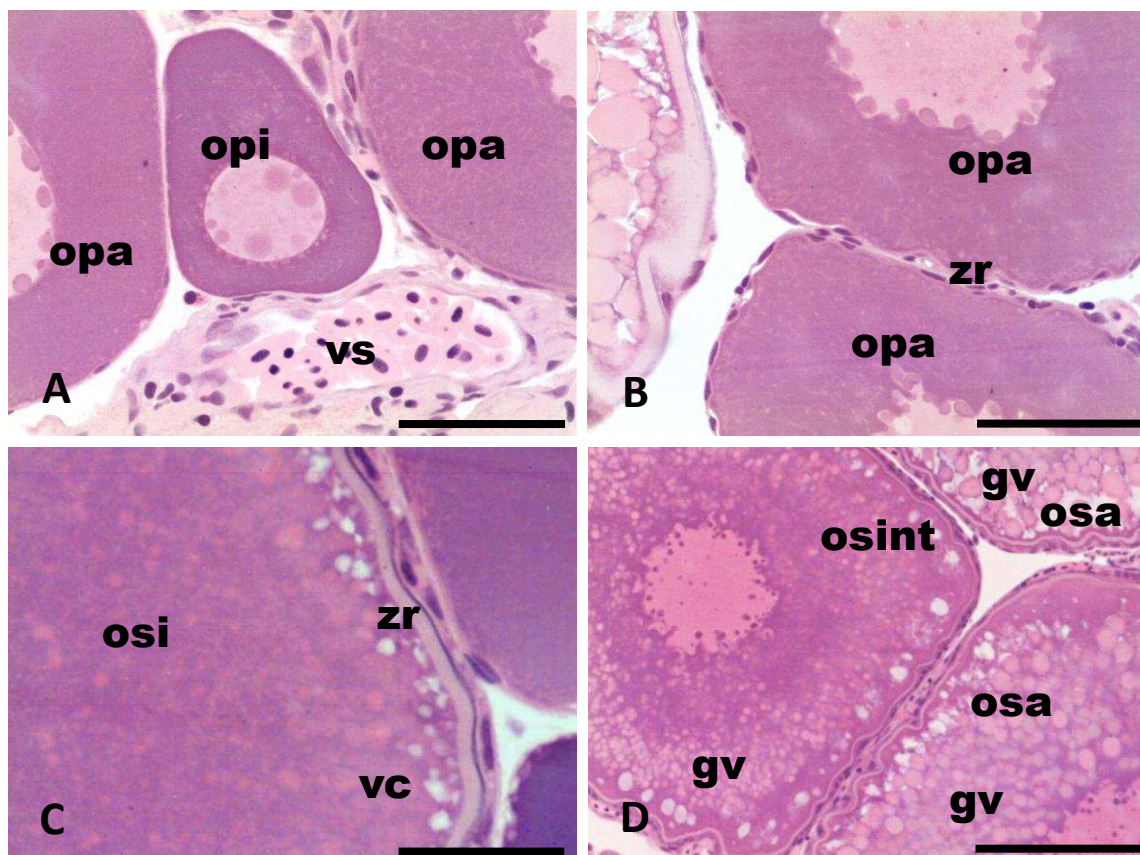


Figura 1. Desenvolvimento folicular ovariano de *Astyanax bimaculatus*. **A:** Estroma ovariano com folículos em desenvolvimento primário inicial (**opi**) e primário avançado (**opa**). **B:** Folículo em desenvolvimento primário avançado (**opa**) com células foliculares pavimentosas e zona radiata delgada (**zr**). **C:** Folículo em desenvolvimento secundário inicial (**osi**) possuindo células foliculares pavimentosas com zona radiata espessa (**zr**) e vesículas corticais claras (**vc**) na periferia do folículo. **D:** Folículo em desenvolvimento secundário intermediário iniciando deposição dos glóbulos de vitelo (**osint**) e folículos em desenvolvimento secundário avançado (**osa**) com glóbulos de vitelo (**gv**) por todo o citoplasma. **vs:** vaso sanguíneo. **Coloração:** Hematoxilina-eosina. **Barra:** A e B (50 μm); C (30 μm); D (100 μm).

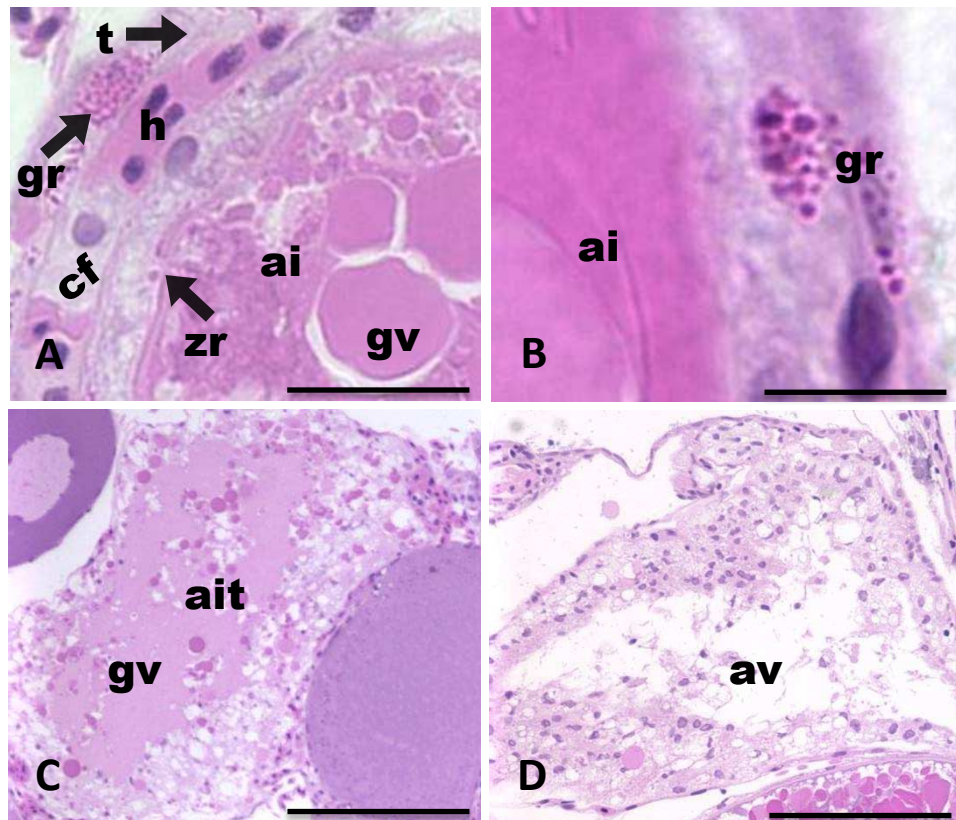
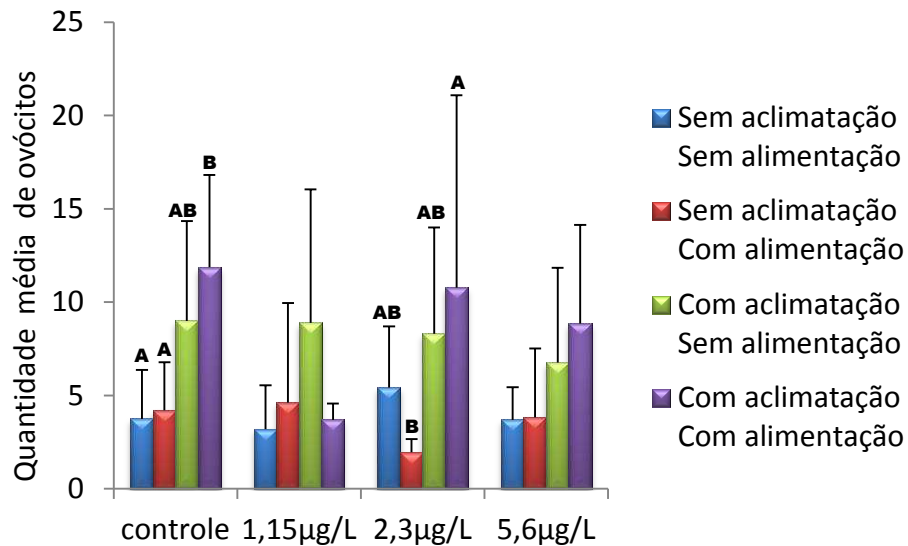


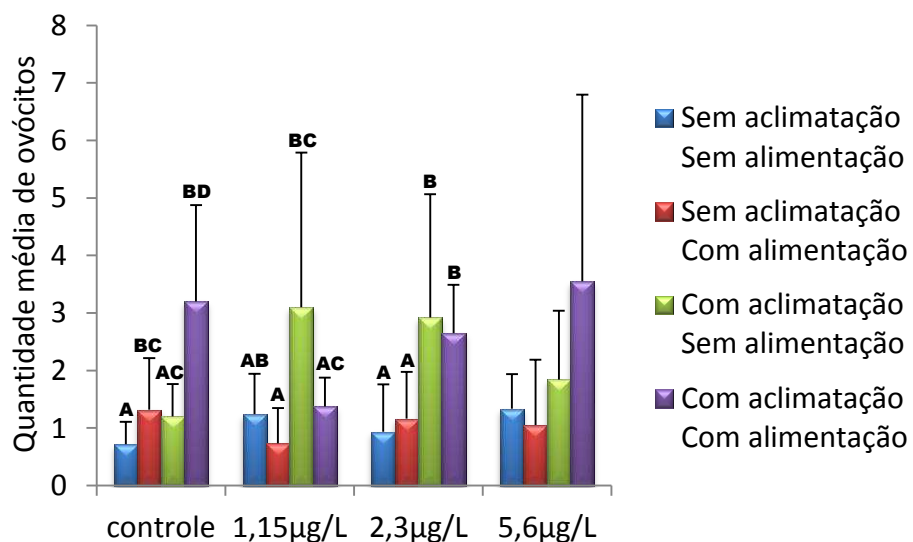
Figura 2. Folículos ovarianos de *Astyanax bimaculatus* em atresia. **A:** Atresia folicular inicial (**ai**) caracterizada pela quebra da zona radiata (**zr**), hipertrofia de células foliculares (**cf**) e presença de granulócitos (**gr**). **B:** Detalhe de granulócito (**gr**) sobre a região de células foliculares. **C:** Atresia folicular intermediária (**ait**) caracterizada pela liquefação dos glóbulos de vitelo (**gv**), desintegração da zona radiata e invasão do citoplasma pelas células foliculares. **D:** Atresia folicular avançada (**av**) caracterizada pela ausência de glóbulos de vitelo. Células da teca (**t**); hemácias (**h**). **Coloração:** Hematoxilina-eosina. **Barra:** A (25 μm); B (10 μm); C (150 μm); D (100 μm).

Figura 3. Número médio de folículos primários iniciais por área ovariana (347 mm²) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e expostos ao Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



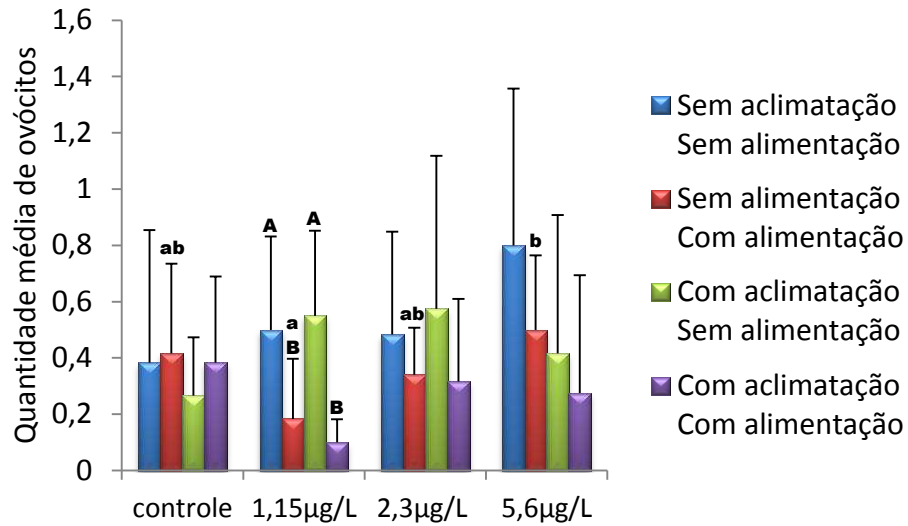
As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Letras maiúsculas indicam diferenças dentro dos grupos (P<0,05) pelo teste de Duncan. Ausência de letra não houve diferença (P>0,05).

Figura 4. Número médio de folículos primários avançados por área ovariana (347 mm²) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



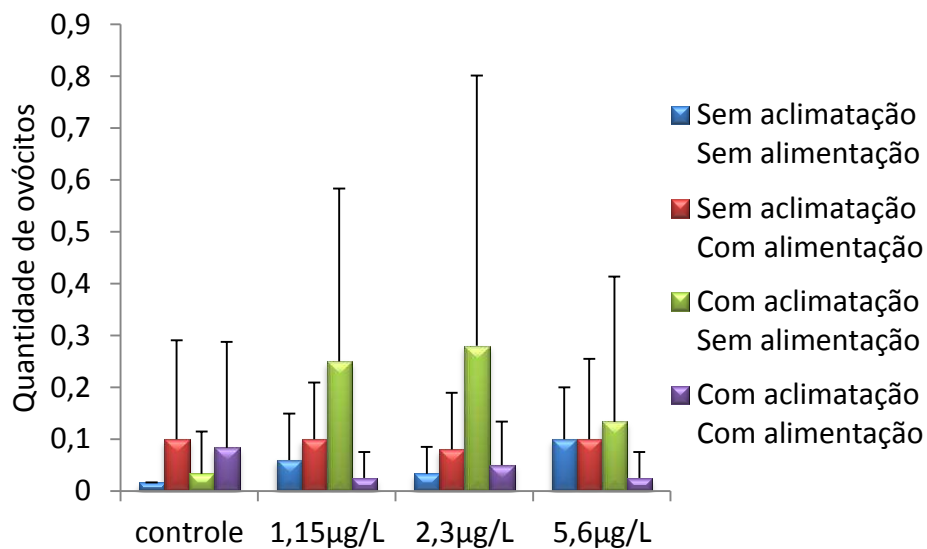
As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Letras maiúsculas indicam diferenças dentro dos grupos (P<0,05) pelo teste de Duncan. Ausência de letra não houve diferença (P>0,05).

Figura 5. Número médio de folículos secundários iniciais por área ovariana (347 mm²) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



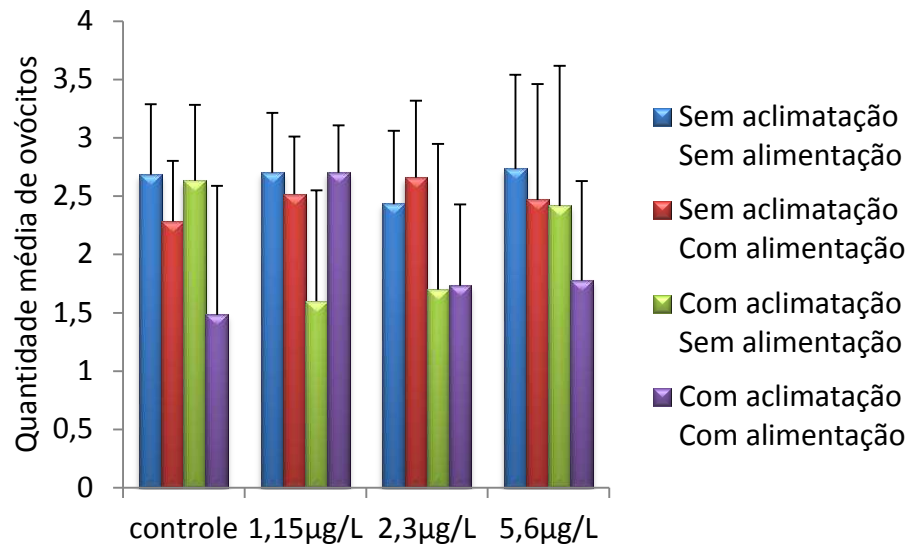
As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças entre os grupos do mesmo experimento (P<0,05); letras maiúsculas indicam diferenças dos grupos com as mesmas concentrações nos diferentes experimentos (P<0,05); ausência de letra não houve diferença (P>0,05). Teste de Duncan.

Figura 6. Número médio de folículos secundários intermediários por área ovariana (347 mm²) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



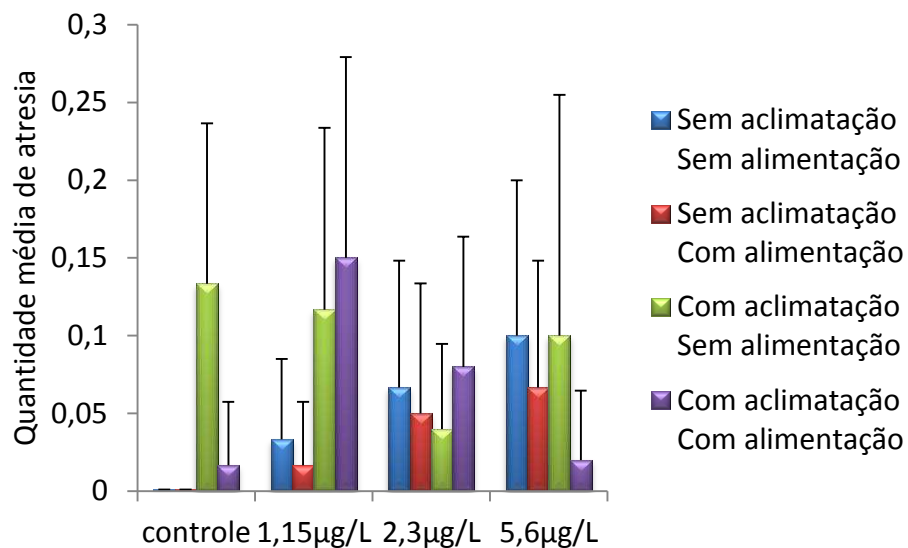
As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Ausência de letra não houve diferença (P<0,05) pelo teste de Duncan.

Figura 7. Número médio de folículos secundários avançados por área ovariana (347 mm²) de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



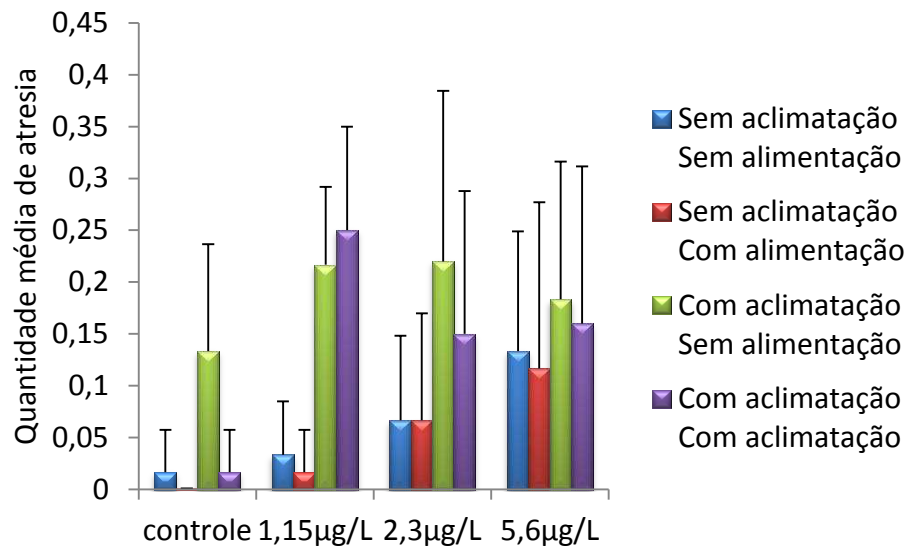
As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Ausência de letra não houve diferença (P>0,05) pelo teste de Duncan.

Figura 8. Número médio de folículos atrésicos iniciais em ovários de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Ausência de letra não houve diferença (P>0,05) pelo teste de Kruskal Wallis.

Figura 9. Número médio de folículos atrésicos totais em ovários de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] dos diferentes experimentos durante 96 horas.



As barras verticais na coluna indicam desvio padrão (n=6). Ausência de letra não houve diferença ($P > 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis

Tabela 2. Diâmetro médio (μm) de folículos secundários avançados de lambaris *A. bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15 $\mu\text{g/L}$	2,3 $\mu\text{g/L}$	5,6 $\mu\text{g/L}$
sem aclimação sem alimentação	534,43 \pm 74,14 ^a	537,96 \pm 77,46 ^a	532,73 \pm 83,00 ^a	500,46 \pm 56,10 ^a
sem aclimação com alimentação	568,07 \pm 66,47 ^a	575,17 \pm 58,49 ^a	590,4 \pm 58,89 ^a	584,49 \pm 68,49 ^a
com aclimação sem alimentação	538,16 \pm 56,84 ^a	518,94 \pm 60,65 ^a	553,93 \pm 61,93 ^a	547,49 \pm 68,49 ^a
com aclimação com alimentação	516,06 \pm 57,57 ^a	578,37 \pm 59,77 ^b	557,74 \pm 78,70 ^{ab}	573,11 \pm 61,78 ^b

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os grupos do mesmo experimento ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Tabela 3. Índice gonadossomático de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15 $\mu\text{g/L}$	2,3 $\mu\text{g/L}$	5,6 $\mu\text{g/L}$
sem aclimação sem alimentação	7,90 \pm 3,18 ^a	7,47 \pm 2,21 ^a	5,05 \pm 2,63 ^a	4,32 \pm 2,55 ^a
sem aclimação com alimentação	8,56 \pm 4,73 ^a	8,13 \pm 6,90 ^a	7,02 \pm 4,30 ^a	6,83 \pm 3,61 ^a
com aclimação sem alimentação	3,73 \pm 2,13 ^a	2,70 \pm 1,47 ^a	3,23 \pm 1,89 ^a	3,99 \pm 2,01 ^a
com aclimação com alimentação	2,27 \pm 1,47 ^a	3,03 \pm 1,06 ^a	3,05 \pm 1,92 ^a	2,93 \pm 1,67 ^a

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos do mesmo experimento ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

Tabela 4: Índice hepatossomático de fêmeas de *Astyanax bimaculatus* nos grupos controles e tratados com Thiodan[®] nos diferentes experimentos.

Experimento	controle	1,15 $\mu\text{g/L}$	2,3 $\mu\text{g/L}$	5,6 $\mu\text{g/L}$
sem aclimação sem alimentação	0,7 \pm 0,14 ^{ab}	0,88 \pm 0,3 ^a	0,84 \pm 0,38 ^a	0,38 \pm 0,31 ^b
sem aclimação com alimentação	1,13 \pm 0,54 ^a	1,04 \pm 0,61 ^a	1,02 \pm 0,50 ^a	1,02 \pm 0,51 ^a
com aclimação sem alimentação	0,66 \pm 0,29 ^a	0,73 \pm 0,20 ^a	0,92 \pm 0,17 ^a	0,91 \pm 0,12 ^a
com aclimação com alimentação	0,74 \pm 0,34 ^a	0,72 \pm 0,29 ^a	0,94 \pm 0,40 ^a	0,63 \pm 0,18 ^a

Valores expressos como média \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferença entre os grupos do mesmo experimento ($P < 0,05$) pelo teste de Duncan.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2ª ed: versão corrigida 31/03/2006. p.19. 2007.
- ALI, S. M.; BOWES, G. W.; COHEN, D. B. **Endosulfan**. Toxic Substances Control Program, California State Water Resources Control Board (SWRCB), Sacramento, CA. Special Projects Report No. 84-7SP, 1984.
- BALLESTEROS, M. L.; BIANCHI, G. E.; CARRANZA, M.; BISTONI, M. A. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 42(4):351-357, 2007.
- BARBIERI, G.; SANTOS, M. V. R.; SANTOS, J. M. Época de reprodução e relação peso corporal/comprimento padrão de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 17:1057-1065, 1982.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in ten Brazilian teleost fish species. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 4:399-410, 1990.
- BGOVAC, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **Journal of Morphology**, 197: 353-369, 1988.
- BUGEL, S. M.; WHITE, L. A.; COOPER, K. R. Impaired reproductive health of killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting Newark Bay, NJ, a chronically contaminated estuary. **Aquatic Toxicology**, 3:182-93, 2010.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, 64:1793-1800, 2006.
- CENGİZ, E. İ.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The Histopathological Effects of thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health**, 36:75-85, 2001.
- CHAKRABARTY, S.; RAJAKUMAR, A.; RAGHUVeer, K.; SRIDEVI, P.; MOHANACHARY, A.; PRATHIBHA, Y.; BASHYAM, L.; DUTTA-GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 155(3):491-497, 2012.
- CHATTERJEE, S.; DASMAHAPATRAA, A. K.; GHOSHA, R. Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, 129:265-273, 2001.
- CHATTERJEE, S.; DUTTA, A. B.; GHOSH, R. Impact of carbofuran in the oocyte maturation of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 32:426-430, 1997.
- CYRINO, J. E. P.; PORTZ, L.; MARTINO, R. Retenção de proteína e energia em juvenis de “Black Bass *Micropterus salmoides*”. **Scientia Agricola**, 57(4):609-616, 2000.
- CONAMA. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2007**. Disponível em: www.mma.gov.br. Acessado em: 12/07/2010.
- CONNAUGHTON, M. A.; AIDA, K. Female reproductive system, in fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopaedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. p.193-205, 1998.

- CORRIERO, A.; MEDINA, A.; MYLONAS, C. C.; ABASCAL F. J.; DEFLORIO, M.; ARAGÓN, L.; BRIDGES, C. R.; SANTAMARIA, N.; HEINISCH, G.; VASSALLO-AGIUS R.; BELMONTE, A.; FAUVEL, C.; GARCIA, A.; GORDIN, H.; DE METRIO, G. Histological study of the effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH_a) on the reproductive maturation of captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). **Aquaculture**, 272:675-686, 2007.
- COWARD, K.; BROMAGE, N. R. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zilli*. **Journal of Fish Biology**, 53:285-302, 1998.
- DRUMMOND, C. D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, 287:176-182, 2000.
- DUTTA, H. M.; DALAL, R. The effect of endosulfan on the ovary of bluegill sunfish: A histopathological study (*Lepomis macrochirus*). **International Journal of Environmental Research**, 2(3): 215-224, 2008.
- DUTTA, H. M.; MAXWELL, L. B. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, *Lepomis macrochirus*. **Environmental Pollution**, 121(1):95-102, 2003.
- EPA. Ambient water quality criteria for endosulfan. United States Environmental Protection Agency. EPA 440/5-80-046. 154p. 1980.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. EU-MRLs Regulation EC 396/2005: regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, p.L70/1-L7016. 2002.
- GLOVER C. N.; PETRI, D.; TOLLEFSEN, K. E.; JØRUM, N.; HANDY, R. D.; BERNTSSEN, M. H. Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. **Aquatic Toxicology**, 84(3):346-355, 2007.
- GRIER, H. J. Ovarian epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). **Journal of Morphology**, 243:265-281, 2000.
- GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. In: **Proceedings of the 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 2002.
- GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, 268:293-310, 2007.
- GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger. 223p, 1986.
- HAZARIKA, R; DAS M. Toxicological impact of BHC on the ovary of the air-breathing Catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 60:16-21, 1998.
- HENRY, L. KISHIMBA, M. A. Pesticide residues in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile Perch (*Lates niloticus*) from Southern Lake Victoria, Tanzania, **Environmental Pollution**, 140:348-354, 2006.
- HERNAN DA CUÑA, H.; VAZ QUEZ, R. G.; PIOL, N. M.; GUERRERO, V. N.; MAGGESE, M. C.; LO NOSTRO, F. L. Assessment of the acute toxicity of the organ ochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74:1065-1073. 2011.

- HONJI, R. M.; NARCIZO, A. M.; BORELLA, M. I.; ROMAGOSA, E.; MOREIRA, R. G. Patterns of oocyte development in natural habitat and captive *Salminus hilarii* Valenciennes, 1850 (Teleostei: Characidae). **Fish Physiology and Biochemistry**, 35:109-123, 2009.
- JENSEN M. K.; KAHL, D. M.; MAKYNEN, A. E.; KORTE, J. J.; LEINO, L. R.; BUTTERWORTH, C. B.; ANKLEY T. G. Characterization of responses to the antiandrogen flutamide in a short-term reproduction assay with the fathead minnow. **Aquatic Toxicology**, 70(2):99-110, 2004.
- LEMAIRE, G.; MNIF, W.; MAUVAIS, P.; BALAGUER, P.; RAHMANI R. Activation of α and β estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. **Life Sciences**, 79:1160-1169, 2006.
- LINARES-CASENAVE, J.; VAN EENENNAAM, J. P.; DOROSHOV S. I. Ultrastructural and histological observations on temperature-induced follicular ovarian atresia in the white sturgeon. **Journal of Applied Ichthyology**, 18:382-390, 2002.
- MAXWELL, L. B.; DUTTA, H. M. Diazinon induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:21-27, 2005.
- MAZZONI, R.; MENDONÇA, R. S.; CARAMASCHI, E. P. Reproductive biology of *Astyanax janaeirensis* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 65:643-649, 2005.
- MCKIM, J. M.; NICHOLS, J. W.; LIEN, G. J.; HOFFMAN, A. D.; GALLINAT, C. A.; STOKES, G. N. Dermal absorption of three waterborne chloroethanes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Fundamental and Applied Toxicology**, 31(2):218-28, 1996.
- MELO, F. C. S. A.; MALDONADO, I. R. S. C.; BENJAMIN, L. A.; MATTA, S. L. P. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*) (Characidae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, 52:811-829, 2005.
- MIRANDA, A. C. L. **Reprodução de *Astyanax bimaculatus lacustris* em viveiros e estudo histológico e ultra-estrutural da atresia folicular de *Astyanax bimaculatus lacustris* e *Leporinus reinhardtii* em gaiolas de aquíicultura**. UFMG, Belo Horizonte, 1996. 138 p. (Dissertação, Mestrado).
- MIRANDA, A. C. L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. **Tissue and Cell**, 31:480-488, 1999.
- MOLINA, D. Anvisa baixa resolução proibindo agrotóxico Endosulfan a partir de 2013. Disponível em: <http://amarnatureza.org.br/site/anvisa-baixa-resolucao-proibindo-ogrotoxico-endossulfan-a-partir-de-2013,67995/>. Acessado em: 20/12/2010.
- MUNOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET S. The ovarian morphology of *Scorpaena notata* shows a specialized mode of oviparity. **Journal of Fish Biology**, 61:877-887, 2002.
- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology, Reproduction, Part. A.**, New York: Academic Press. 9:223-275, 1983.
- NBR15088-ABNT. Ecotoxicologia aquática- Toxicidade aguda- Método de ensaio com peixes. NBR 15088: 2007.
- PATÍÑO, R.; SULLIVAN, C. V. Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, 26:57-70, 2002.

- PEREIRA, V. M.; BORTOLOTTI, J. W.; KIST L. W.; AZEVEDO, M. B.; FRITSCH, R. S.; OLIVEIRA, R. D. A. L.; PEREIRA, T. C.; BONAN, C. D.; VIANNA, M. R.; BOGO, M. R. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology**, 33(3):469-75, 2012.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina, PR: Grafmarke, p. 591, 2005.
- SAIDAPUR, S. K. Follicular atresia in the ovaries of non mammalian vertebrates. **International Review of Cytology**, 54:225-244, 1978.
- SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. **Journal of Fish Biology**, 67:1446-1459, 2005.
- SANTOS H. B.; THOME, R. G.; ARANTES, F. P.; SATO Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). **Theriogenology**, 70:1449-1460, 2008.
- SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **American Zoologist**, 26:173-192, 1986.
- STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 23p., (Report B 81/86), 1986.
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 6:287-318, 1996.
- VIZZIANO, D.; BEROIS, N. Histología del ovario de *Macrodon ancylodon* (Bloch y Schneider, 1801) (Teleostei: Sciaenidae) ovogénesis. Folículos post-ovulatorios. Atresia. **Revista Brasileira de Biologia**, 50:523-536, 1990.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. The fate organic pollutants in individuals and in ecosystems. In: **Principles of ecotoxicology**. Taylor & Francis, London, p. 67-76, 1996.

5.3. CAPÍTULO 3

RELAÇÃO ENTRE COLÁGENO TIPO IV, INTEGRINA β 1 E CASPASE 3 DURANTE O DESENVOLVIMENTO FOLICULAR EM *Astyanax bimaculatus* EXPOSTOS AO THIODAN[®]

RESUMO

O agrotóxico Thiodan[®] (350g/L de endosulfan) é um inseticida organoclorado utilizado em diversas monoculturas e pode chegar aos ecossistemas aquáticos, afetando a reprodução e a integridade das populações de peixes. Ovários de peixes apresentam ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento, os quais são envoltos por zona radiata, células foliculares, membrana basal e células da teca, formando o complexo folicular. A integridade do complexo folicular está associada com a presença de colágeno tipo IV e integrina β 1, enquanto a caspase 3 é uma protease importante na via apoptótica, participando ativamente nos processos de regressão ovariana. Pela carência de estudos que avaliam tais proteínas no complexo folicular, este estudo teve por objetivo avaliar, por meio de análise imunoistoquímica, a expressão das proteínas colágeno tipo IV, integrina β 1 e caspases 3 durante o desenvolvimento folicular do lambari *Astyanax bimaculatus* exposto ao Thiodan[®]. Os peixes foram aclimatados durante 10 dias em aquários de 50L com aeração contínua, água sem cloro, filtro mecânico, fotoperíodo (12h) e temperatura ($26\pm 1^\circ\text{C}$) controlados. Para a exposição ao Thiodan[®], os peixes foram divididos em quatro grupos: controle; 1,15; 2,3 e 5,6 $\mu\text{g/L}$, com três repetições em cada concentração. Após 96 h, seis peixes de cada grupo foram anestesiados (benzocaína/1:10.000), eutanasiados e seus ovários coletados para detecção de colágeno de tipo IV, integrina β 1 e caspase 3. Fragmentos dos ovários foram fixados em paraformaldeído a 4% e incluídos em parafina. Os procedimentos de imunomarcção seguiram protocolos já padronizados para os anticorpos empregados. A reação foi revelada com diaminobenzidina e os cortes foram contracolorados com hematoxilina para avaliação qualitativa em microscópio de luz. Os folículos primordiais não apresentaram marcação para colágeno tipo IV e integrina β 1. Nos folículos em desenvolvimento primário observou-se reação fracamente positiva no citoplasma das células foliculares, enquanto folículos em desenvolvimento secundário foram mais intensamente marcados para integrina β 1 e colágeno tipo IV. A imunomarcção para caspase 3 foi evidenciada nas células foliculares durante o desenvolvimento secundário, sendo mais intensa no estágio avançado. Qualitativamente, essas análises demonstraram

marcação crescente e uniforme ao longo do desenvolvimento folicular, mesmo com os peixes expostos a diferentes concentrações de Thiodan[®], o que caracteriza a integridade das células foliculares e da via apoptótica caspase-3-dependente, que pode estar sendo ativada para futuros processos de regressão folicular.

Palavras-chave: ecotoxicologia aquática, ovário, peixes e reprodução.

1. INTRODUÇÃO

O Thiodan[®] é um inseticida de uso comercial que consiste na mistura de dois isômeros ativos, sendo 70% de α -endosulfan e 30% de β -endosulfan. Endosulfan é um hidrocarboneto clorado usado como inseticida de amplo espectro, que controla insetos por ação de contato e ingestão (Stumpf & abhaver, 1986; Chakrabarty et al., 2012). Atualmente, foi banido em vários países pela sua alta toxicidade (Molina, 2010). O tóxico pode chegar ao meio aquático pelo escoamento superficial e infiltração no solo por meio da irrigação agrícola e das chuvas, colocando em riscos toxicológicos os organismos que ali residem (Walker et al., 1996; Capkin et al., 2006; Glover et al., 2007). Conseqüentemente, o endosulfan pode acumular nos tecidos destes organismos, como já observado por Henry & Kishimba (2006) na espécie de peixe *Oreochromis niloticus*. No entanto, a União Européia estabelece como limite máximo de endosulfan em gordura, o valor de $0,05\text{mg/kg}^{-1}$ (EPA 2002), e em água doce, $0,22\mu\text{g/L}^{-1}$ (EPA 1980). A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente, levando em consideração a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA - nº 357/2005, estabelece o valor limite de $0,056\mu\text{g/L}$ de resíduo do referido inseticida e seus metabólitos nas águas doces de classe 1.

Muitos inseticidas apresentam baixa toxicidade antes de serem transformados em substâncias tóxicas metabolicamente ativas. O sulfato de endosulfan é um dos produtos derivados do metabolismo do endosulfan, sendo considerado o principal metabólito devido à sua importância toxicológica, por ser mais estável no meio ambiente em relação a sua fórmula original (Ali et al., 1984). A sensibilidade dos organismos aquáticos ao endosulfan é baixa e tem sido bem descrita na literatura por alguns autores (Cengiz et al., 2001; Capkin et al., 2006; Ballesteros et al., 2007; Pereira et al., 2012), sendo os machos geralmente mais sensíveis que as fêmeas pelo armazenamento de lipídeos para produção do vitelo e fornecimento de energia, e pelo tamanho maior da fêmea em relação ao macho (Ballesteros et al., 2007).

O desenvolvimento folicular em peixes tem sido descrito por vários pesquisadores (Bazzoli & Rizzo, 1990; Tyler & Sumpter, 1996; Begovac & Wallace, 1988; Grier, 2000, 2002 e 2007) e, como nos animais em geral, compreende os períodos pré-meiótico, perinucleolar, vitelogênico e maturação final. Estas fases ocorrem no interior de folículos cujo complexo folicular é constituído por zona radiata, camada folicular, membrana basal e teca (Grier, 2000), as quais desempenham importante papel durante a foliculogênese e fertilização.

Entretanto, os peixes quando são expostos aos poluentes podem sofrer influência na foliculogênese, e assim acarretar prejuízos reprodutivos para as espécies expostas aos contaminantes. Alguns estudos mostram diversas alterações provocadas nos folículos de peixes por contaminantes (Hazarika & Das, 1998; Dutta et al., 2003; Maxwell & Dutta, 2005; Chakrabarty et al., 2012), inclusive a atresia folicular, que é um processo frequentemente observado nos ovários dos vertebrados (Saidapur, 1978, Santos et al. 2008a; Santos et al. 2008b) e que pode ser causada por diversos fatores, dentre os quais, os agrotóxicos (Nagahama, 1983; Guraya, 1986; Chatterjee et al., 1997 e 2001; Dutta & Dalal, 2008).

No desenvolvimento folicular, a formação do complexo folicular é importante no suporte e na sobrevivência das células foliculares. No entanto, já foram identificadas várias proteínas que contribuem para a integridade do complexo folicular, como laminina, integrina β_1 , fibronectina, colágeno tipo IV e de metaloproteinases (MMM-P) em folículos pós-ovulatórios e atrésicos (Rodgers et al., 1998; Grier, 2002; Le Bellego et al., 2002; Berkholtz et al., 2006; Santos et al., 2008a; Thomé et al., 2010). O colágeno tipo IV é uma proteína especializada da matrix extracelular e membrana basal, assim como a laminina. Essas proteínas estão envolvidas em favorecer um microambiente para sobrevivência das células do epitélio (Rodgers et al., 2003). As integrinas compreendem uma grande família de receptores celulares composto de subunidades α e β que tem função importante na adesão e transmissão de sinais na célula. Além disso, as integrinas estão envolvidas na proliferação, diferenciação e morte celular.

A caspase 3 é uma molécula efetora de grande importância no processo de apoptose, na ativação de endonucleases e na clivagem das proteínas celulares, causando mudanças morfológicas celulares (Huettenbrenner et al. 2003). Este processo de apoptose envolve uma cascata de eventos bioquímicos com a liberação de fatores mitocondriais de morte celular, ativação caspases e mudança na característica morfológica no núcleo da célula, assim como fragmentação do DNA (Huettenbrenner et

al. 2003). No entanto, alguns trabalhos citam a importância da integridade do complexo folicular com a presença de integrina $\beta 1$ e colágeno tipo IV que, em caso de atresia folicular e ovulação na formação de folículos pós-ovulatórios, culminam em processo de ativação das caspases nas células foliculares. Sendo assim, a incidência de apoptose nas células foliculares aumenta nas etapas de regressão ovariana (Drummond et al., 2000; Santos et al., 2003; 2005; 2008).

O lambari *A. bimaculatus* foi escolhido como organismo experimental, pois é muito representativo no ecossistema, sendo encontrado desde o nordeste brasileiro até a Bacia do rio da Prata na Argentina (Barbieri et al., 1982). Também é um peixe de pequeno porte e fácil de manter em laboratório. O complexo folicular associado à síntese dessas proteínas ao longo do desenvolvimento folicular é algo a ser discutido. Porém, nenhum trabalho relata estas proteínas em peixes expostos ao Thiodan[®]. Devido à carência de estudos que avaliem tais proteínas no complexo folicular, o presente trabalho tem como objetivo avaliar as proteínas colágeno tipo IV, integrina $\beta 1$ e caspase 3 durante o desenvolvimento folicular do lambari *A. bimaculatus* exposto ou não ao Thiodan[®] por meio de análise imunoistoquímica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa. Os peixes foram mantidos no Biotério de Peixes do Departamento de Veterinária, onde foram realizados o teste subletal e as atividades de coleta, fixação e inclusão dos fragmentos de ovários. As etapas de microtomia, imunoistoquímica, coloração de lâminas histológicas e as análises histológicas foram realizadas no DVT/UFV e no Laboratório de Ictiohistologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais.

2.1. Animais

Foram utilizadas fêmeas de *A. bimaculatus* obtidas de tanques de terra na Piscicultura da Prata, Eugenópolis/MG. Para o presente estudo, foram selecionadas fêmeas de lambari em maturação avançada, com peso de $11,52 \pm 2,0$ g e comprimento total de $9,12 \pm 0,64$ cm. As características para a escolha dos peixes em maturação avançada se basearam em aspectos corporais, como ventre abaulado, poro genital dilatado e vascularizado.

Os peixes foram transportados para o Biotério de Peixes do DVT/UFV, onde foram aclimatados por 10 dias. Os aquários onde os animais foram mantidos possuíam capacidade de 50 litros numa densidade de 0,5g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, temperatura controlada e monitoramento duas vezes ao dia. Todos os aquários possuíam um sistema de filtração (250L/h), e aeração contínua da água para garantir o bem-estar dos peixes. Os peixes foram alimentados com ração comercial Purina contendo 35% de proteína, duas vezes ao dia, de acordo com o manejo da piscicultura.

As características da água utilizada no teste em sistema estático foram mantidas de acordo com as recomendações da NBR 15088 (ABNT, 2007) com temperaturas de $25,5 \pm 1,0$ °C, livre de cloro, pH $7,2 \pm 0,3$; oxigênio dissolvido $6,9 \pm 0,6$ mg/L⁻¹ e dureza total (CaCO₃) $28,15 \pm 5,94$ mg/L⁻¹.

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária/UFV (protocolo 24/2009). O médico veterinário responsável foi o Doutor Laércio dos Anjos Benjamin (CRMV-MG 3387).

2.2. Agrotóxico

Para a avaliação proposta no presente trabalho, foi utilizado o inseticida organoclorado Thiodan[®] (Bayer) em sua apresentação comercial com 350g/L⁻¹ de endosulfan.

2.3. Teste da toxicidade subletal em sistema estático

Foram aclimatados 96 lambaris como descrito no item 2.1., onde os peixes se acostumaram ao seu novo meio e às atividades normais de manutenção, como alimentação e limpeza dos aquários. O teste de toxicidade subletal com o endosulfan foi realizado baseando-se nas normas técnicas para teste em sistema estático de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007).

Logo após aclimatação, os peixes foram submetidos ao tóxico Thiodan[®] (endosulfan 350g/L) por 96 horas. Em todos os experimentos foram utilizadas três concentrações diferentes do Thiodan[®], inferiores à CL₅₀ (13,7µg/L) pré-determinada em laboratório de acordo com a NBR 15088 (ABNT, 2007). As concentrações utilizadas em cada experimento foram de 1,15; 2,3 e 5,6µg/L, além de um grupo controle sem tóxico, com três repetições sob as mesmas condições para cada concentração.

2.4. Análises histológicas e imunoistoquímicas

Após 96 horas de experimento, seis fêmeas de cada grupo foram coletadas, anestesiadas com benzocaína (1/10.000) e eutanasiadas para coleta dos ovários. Para a descrição histológica todas as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 24 horas, e incluídas em parafina. Em seguida, secções com 5 µm de espessura foram coradas utilizando hematoxilina/eosina para análises morfológicas do desenvolvimento folicular.

Para detectar a imunorreatividade para colágeno tipo IV, integrinas β_1 e caspase 3 nos ovários do lambari, três espécimes de cada grupo foram fixados em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 24 horas, incluídas em parafina, e seccionadas com 5 µm de espessura. A recuperação antigênica foi realizada em forno de microondas, por 10 minutos, com os cortes nas lâminas sendo imersos em tampão citrato 10mM, pH 6,0. As lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% em tampão fosfato, por 15 minutos, em temperatura ambiente, para inativar peroxidase endógena, e com soro albumina bovina a 2%, por 45 minutos, para bloquear marcador antigênico inespecífico. Anticorpos primários (policlonais de coelho) anti-colágeno tipo IV, anti-integrina β_1 e anti-caspase 3 (Santa Cruz Biotechnology, Calif., USA) foram aplicados nas secções a 4°C na diluição 1:100 (integrina β_1 e colágeno tipo IV) e 1:200 (caspase 3), segundo o fabricante, por 12 horas. Os cortes foram lavados em PBS e incubados por 45 minutos com anticorpo secundário na diluição de 1:200 anti-IgG de coelho (LSAB 2 sistema HRP; DakoCymation, Carpinteria, Calif., USA) e tratados com peroxidase conjugada com estreptavidina por 45 minutos. A revelação foi realizada com diaminobenzidina (DAB) e as lâminas foram contracoradas com hematoxilina (Santos et. al., 2008).

As lâminas foram analisadas em toda sua extensão em busca de alterações na imunomarcção no complexo folicular que pudessem ser representativas do efeito do Thiodan[®], sempre comparando com o padrão de organização dos ovários do grupo controle. As lâminas foram analisadas em microscópio de luz CX31 Olympus e as imagens foram obtidas com câmera digital SC 020 por meio do software Analysis GETIT, Olympus.

3. RESULTADOS

3.1. Desenvolvimento folicular

O desenvolvimento folicular de *A. bimaculatus* foi dividido em desenvolvimento primário inicial e avançado. O desenvolvimento secundário foi dividido em desenvolvimento secundário inicial, intermediário e avançado (Tabela 1). A regressão ovariana também foi caracterizada (Tabela 1).

Tabela 1. Aspectos morfológicos do desenvolvimento folicular e da regressão ovariana de *Astyanax bimaculatus*.

Folículos primordiais: Estádio que antecede o desenvolvimento de folículos primários. São células menores, apresentando citoplasma volumoso, núcleo esférico e grande, e células pré-foliculares (Figura 1 B).

Folículos primários iniciais e primários avançados (perinucleolares): No desenvolvimento primário inicial, os ovócitos apresentam citoplasma fortemente basófilo, núcleo esférico e nucléolos dispersos pelo nucleoplasma. Estão envoltos por células foliculares pavimentosas (Figuras 1 C-encarte). No folículo primário avançado, a camada de células foliculares é pavimentosa e com o núcleo elíptico. Entre as células foliculares e o ooplasma, surge a zona radiata como uma fina camada (Figura 1 E-encarte).

Folículos secundários iniciais: O citoplasma ovocitário é granular e fracamente basófilo, com presença de vesículas corticais pequenas e claras na periferia do citoplasma. O núcleo é central, ligeiramente acidófilo, com nucléolos pequenos e dispersos pelo nucleoplasma (Figura 1 G-encarte).

Folículos secundários intermediários: Assim como na etapa anterior, os folículos secundários intermediários possuem ovócito com núcleo central e acidófilo. No citoplasma, inicia-se a deposição de vitelo a partir da região periférica (Figura 1 H-encarte).

Folículos secundários avançados (vitelogênicos): No folículo secundário avançado, o diâmetro e o volume citoplasmático aumentam mais em relação ao núcleo, apresentando os folículos neste estágio, vesículas corticais na periferia e glóbulos de vitelo disperso por todo citoplasma. No complexo folicular, a membrana basal é delgada e a zona radiata mais espessa que nas fases anteriores, com células foliculares pavimentosas e cúbicas (Figura 1 H-encarte).

Folículos atrésicos: Apresenta formato irregular, com estruturas descontínuas ou desorganizadas com aspecto de grumos, devido à liquefação dos grânulos de vitelo ou com perda da conectividade entre suas partes, fragmentação da zona radiata (atresia inicial) e absorção total do conteúdo ovocitário pelas células foliculares (atresia avançada) (Figuras 3 A e B-encarte)

Folículos pós-ovulatórios: O folículo pós-ovulatório possui lume amplo, irregular e contínuo com o lume do ovário. Apresenta parede constituída por camada única de células foliculares, membrana basal e teca (Figuras 3 E e F).

3.2. Expressão de colágeno tipo IV, integrina $\beta 1$ e caspase 3 no desenvolvimento folicular de *A. bimaculatus* expostos ao Thiodan[®]

Os folículos nos diferentes estádios de desenvolvimento apresentaram diferentes graus de marcação para integrina $\beta 1$ e colágeno tipo IV. Em folículo primordial não se observou marcação para colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$ (Figura 1 B). Nos folículos em desenvolvimento primário inicial foram evidenciadas reações positivas com marcação fraca para colágeno e integrina (Figuras 1 C e D), enquanto nos folículos em desenvolvimento primário avançado as marcações foram mais nítidas (Figuras 1 E e F). Nos desenvolvimento secundário foram evidenciadas marcações positivas para integrina $\beta 1$ e colágeno tipo IV no citoplasma das células foliculares com mais intensidade que nos estádios anteriores (Figuras 1 G e H). Estas marcações não mostraram diferenças entre os grupos expostos ao Thiodan[®] quando comparados com os mesmos estádios de desenvolvimento folicular dos grupos controle. A marcação para caspase 3 foi evidenciada no citoplasma e núcleos de células foliculares de folículos com desenvolvimento secundário avançado, apresentando maior intensidade nos estádios de desenvolvimento secundário inicial. A marcação foi ausente nos estádios de desenvolvimento primário (Figuras 2 A-D). Quando comparadas estas marcações entre os grupos controle e expostos ao Thiodan[®], não houve diferenças nas marcações entre os mesmos estádios de desenvolvimento folicular.

3.3. Expressão de colágeno tipo IV, integrina $\beta 1$ e caspase 3 na atresia folicular de *A. bimaculatus* expostos ao Thiodan[®]

A marcação para colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$ foi evidente nos folículos atrésicos iniciais, porém; menos intensa em relação aos folículos normais (Figuras 3 A e C). As fases mais avançadas da atresia folicular são caracterizadas pela desorganização, espalhamento das proteínas no ooplasma, com reação mais fraca da imunomarcação para colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$ (Figuras 3 B e D). Para a caspase 3 foi observada a marcação positiva nas células foliculares em folículos atrésicos iniciais e avançados (Figuras 4 A e B).

3.4. Expressão de colágeno tipo IV, integrina $\beta 1$ e caspase 3 em folículos pós-ovulatórios de *A. bimaculatus* expostos ao Thiodan®

Foram evidenciados desorganização e espalhamento do colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$ entre as células foliculares, com marcação positiva (Figuras 3 E e F). Em folículos pós-ovulatórios também foi observada marcação positiva para caspase 3 nas células foliculares (Figuras 4 C e D).

4. DISCUSSÃO

As fêmeas de *A. bimaculatus* submetidas à ação do tóxico apresentaram ovários com padrões normais do desenvolvimento folicular, sendo as variações na estrutura do folículo, como diâmetro, características do núcleo, camadas envoltórias, composição e distribuição do vitelo, observadas em outras espécies do gênero do presente estudo (Miranda, 1996; Miranda et al. 1999; Melo et al., 2005; Mazzoni et al., 2005; Rodrigues et al., 2005). Em outros trabalhos (Chatterjee et al., 1997; Dutta & Dalal, 2008), são demonstrados que pequena concentração de contaminantes pode ser suficiente para causar alterações na morfologia dos folículos. Entretanto, Ballesteros et. al (2007) utilizando peixes machos e fêmeas da espécie *Jenynsia multidentata* verificaram que o maior teor de lipídeos nas fêmeas foi importante para conferir maior resistência contra o endossulfan, ao contrário dos machos, que são mais susceptíveis. Estudo realizado por Hernan Da Cuña et al. (2011) mostrou que a espécie *Cichlasoma dimerus* exposta ao endossulfan nas concentrações de zero; 0,25; 1; 2; 3; 4 e 16 μ g/L não apresentou alterações morfológicas nos folículos, assim como no presente trabalho com *A. bimaculatus*.

No presente estudo, a ausência de marcação para colágeno tipo IV em folículos primordiais pode ter ocorrido em função da quantidade reduzida de células foliculares e pela pequena espessura da membrana basal nesta fase de desenvolvimento folicular. Na literatura é mencionado que a espessura da membrana basal em folículos secundários avançados de *A. bimaculatus* é de aproximadamente 0,3 μ m, caracterizada por ser uma estrutura muito mais delgada quando comparada a outras espécies de teleósteos (Drummond et al., 2000). Outros autores, no entanto, observaram positividade para colágeno tipo IV na membrana basal envolvendo ovogônias no estroma ovariano de peixes (Grier, 2002; Thomé et al. 2010), fase que antecede o ovócito primordial.

A síntese de membrana basal tem sido atribuída às células foliculares (Le Mim et al., 2007), mas ainda faltam investigações que evidenciem esta função. A análise por hibridização *in situ* na cadeia $\alpha 1$ do colágeno tipo IV revelou a presença de mRNA localizada na camada folicular de todos os folículos em crescimento no peixe medaka *Oryzias latipes* (Kato et al., 2010), enquanto para integrinas, Itami et al. (2011) não identificaram marcação em folículos primordiais em ratos. Estes estudos confirmam que durante o desenvolvimento do folículo primordial poderia estar ocorrendo o início da organização e síntese do colágeno tipo IV para as fêmeas do presente estudo.

Logo em seguida, o desenvolvimento folicular primário inicial e avançado foi caracterizado por alterações no complexo folicular, com marcação positiva para integrina $\beta 1$ e colágeno tipo IV foi positiva. Em outro estudo realizado para marcação de várias subunidades do colágeno tipo IV em folículos de bovinos, a expressão das cadeias $\alpha 3$ e $\alpha 6$ diminuíram durante o desenvolvimento folicular, enquanto as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ continuaram a ser expressas ao longo do desenvolvimento (Rodgers et al., 1998). Em estudo com ratos foi verificado o declínio de colágeno tipo IV $\alpha 3$ ao longo do desenvolvimento folicular, mas foi possível detectar o colágeno tipo IV $\alpha 4$ e $\alpha 5$ em folículos desenvolvidos (Frojdman et al., 1998). Entretanto, Berkholtz (2006) observou aumento da marcação para colágeno tipo IV ao longo do desenvolvimento folicular em ratos. Além disso, outra característica importante é presença de perlecan e nidogen que fazem parte das ligações cruzadas em folículos em desenvolvimento secundário, mas não em folículos em desenvolvimento primário (McArthur et al., 2000). Porém, as diferentes ligações cruzadas entre os colágenos e lamininas nas membranas basais também garantem maior expansão no alargamento do folículo (Rodgers et al., 2003). Portanto, é de grande importância nesta etapa de desenvolvimento folicular, a evidência do colágeno tipo IV e integrinas, o que pode contribuir na organização coordenada no desenvolvimento folicular de *A. bimaculatus* com estas proteínas da matriz extracelular.

Em relação às fases de desenvolvimento primário e secundário foram observadas marcações positivas para colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$, o que parece caracterizar maior síntese destas proteínas nestes estádios do desenvolvimento folicular. Entretanto, deve-se considerar que nas fases mais avançadas, a quantidade de células foliculares e células da teca são mais numerosas, sendo assim, exercem função importante na integridade folicular. No presente estudo, a marcação contínua de colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$ nos diferentes estádios de desenvolvimento folicular em 96 horas de experimento indicou que não houve desorganização na membrana basal e nas células

foliculares. Thomé et al. (2010) identificaram por técnicas de imunoistoquímica e imunofluorescência a presença de laminina $\beta 2$, integrinas e colágeno tipo IV na membrana basal, demonstrando a importância destes constituintes na integridade da membrana basal ao longo do desenvolvimento folicular, resultados observados também em folículos de mamíferos (Le Bellego et al., 2002; Berkholtz et al., 2006).

Em folículos de ratos também foi evidenciada a presença de integrinas ao longo do desenvolvimento folicular, apresentando marcação positiva no desenvolvimento primário e marcação mais intensa no desenvolvimento secundário (Itami et al., 2011). Portanto, a marcação positiva nas células foliculares em lambaris *A. bimaculatus* nos grupos controle e expostos ao Thiodan[®] mostrou que a integridade dos folículos em desenvolvimento primário e secundário não foi afetada pelas concentrações de Thiodan[®] utilizadas.

Em relação à caspase 3 ao longo do desenvolvimento folicular, foi possível evidenciar sua expressão nos estádios de desenvolvimento secundário, mas não a presença de condensação de núcleos e corpos apoptóticos nas células foliculares. No entanto, a presença de caspase 3 nas células foliculares de *A. bimaculatus* indica que estas células podem estar em via apoptótica; porém, outros trabalhos demonstram que a via para caspase 3 é observada em folículos pós-ovulatórios, atresias iniciais e, principalmente, nas atresias avançadas, com a presença de fragmentação de DNA, condensação nuclear e formação de corpos apoptóticos (Hsueh et al., 1994; Santos et al., 2008). A ausência destas características morfológicas nos folículos de *A. bimaculatus* do presente estudo pode ser explicada por inibidores de apoptose (Salvesen & Duckett, 2002) que podem estar ativos e protegendo as células contra apoptose. Outros exemplos citados são os fatores hormonais, como as gonadotropinas, 17β estradiol e fator de crescimento epidérmico, que agem como fatores de sobrevivência para suprimir a morte celular por apoptose em folículos ovarianos de ratos em cultura (Chun et al., 1994) e também no peixe truta arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (Janz & Van Der Kraak, 1997). Segundo Salvesen & Duckett (2002) poucos estudos têm tentado esclarecer se uma determinada célula consegue se recuperar de um efeito fisiológico de caspases quando estão sendo processadas e ativadas.

Um grupo de proteínas estruturalmente relacionadas à inibição da apoptose é o inibidor de apoptose (IAP) (Deveraux & Reed, 1999). São descritos pelo menos oito IAPs em humanos localizados no citoplasma, e que se ligam na forma ativa da caspase 3 ou na forma zimogênio das caspases para inibir a sua função (Salvesen & Duckett,

2002). Janz et al. (1997) mencionam forte relação com o aumento da apoptose e expressão de proteína do choque térmico HSP70 em peixes expostos à celulose, afetando o tamanho do ovário, provocando queda da concentração plasmática de testosterona e indução nas concentrações plasmáticas de 17β estradiol. Em relação à HSP70, ela pode estar relacionada com a proteção das células foliculares antes da reabsorção do vitelo em folículos atrésicos (Santos, et al., 2008). A relação mais consistente da viabilidade dos folículos de *A. bimaculatus* no presente estudo, segundo a literatura, pode ser a relação dos inibidores de apoptose associado com os fatores hormonais, agindo como prevenção na sobrevivência das células foliculares no desenvolvimento folicular secundário.

Nas fêmeas do lambari *A. bimaculatus*, o processo de atresia foi semelhante ao descrito por Miranda et al. (1999), Munoz et al. (2002); Melo et al. (2005) e Santos et al. (2005). A maior frequência de atresia foi observada em folículos secundários. Observações semelhantes foram feitas por Drummond (1996) em *A. bimaculatus lacustris* e Melo et al. (2005) em *A. scabripinnis*. Em relação aos folículos pós-ovulatórios, ocorre perda de contato entre as membranas das células foliculares adjacentes, evento observado por Santos et al. (2005) entre 48 e 72 horas pós-desova em *Leporinus taeniatus*. Essas estruturas foram raramente encontradas no presente estudo, indicando que o grau de contaminação pelo Thiodan[®] não interferiu na eliminação dos folículos de *A. bimaculatus* em maturação avançada.

Nos processos de atresias e nos folículos pós-ovulatórios ocorreram a desorganização e a perda da positividade da imunomarcagem para colágeno tipo IV e integrinas nas fases avançadas quando comparadas com as fases iniciais da regressão ovariana, sendo esta característica também observada por outros autores (Santos et al., 2008; Thomé et al., 2010). Relatos importantes sobre a integridade dos folículos estão na diminuição da integrina $\beta 1$ e colágeno do tipo IV contribuindo para o aumento da apoptose em células foliculares de folículos pós-ovulatórios e nas atresias avançadas (Santos et al., 2008). Além disso, outros fatores contribuem para o aumento da apoptose, como a diminuição da concentração de 17β estradiol logo após a desova, favorecendo a regressão ovariana dos folículos pós-ovulatórios (Kaptaner & Ural 2006). Portanto, o presente estudo com as fêmeas de *A. bimaculatus* evidencia a caspase 3, e a diminuição da marcação com integrina $\beta 1$ e colágeno tipo IV nas células foliculares nos folículos atrésicos e pós-ovulatórios, o que sugere a provável ação destas proteínas na regressão folicular em lambaris expostos ao Thiodan[®].

De acordo com os resultados obtidos, pode-se inferir que os ovários *A. bimaculatus* foram resistentes ao Thiodan[®] nas concentrações testadas e no período experimental proposto, pois tais concentrações não interferiram de modo significativo na estrutura do complexo folicular e no desenvolvimento folicular. Qualitativamente, essas análises demonstraram a marcação crescente e uniforme ao longo do desenvolvimento folicular, mesmo quando os peixes foram expostos a diferentes concentrações de Thiodan[®], o que caracteriza a integridade das células foliculares e da via apoptótica caspase-3-dependente, que pode estar sendo ativada para futuros processos de regressão folicular.

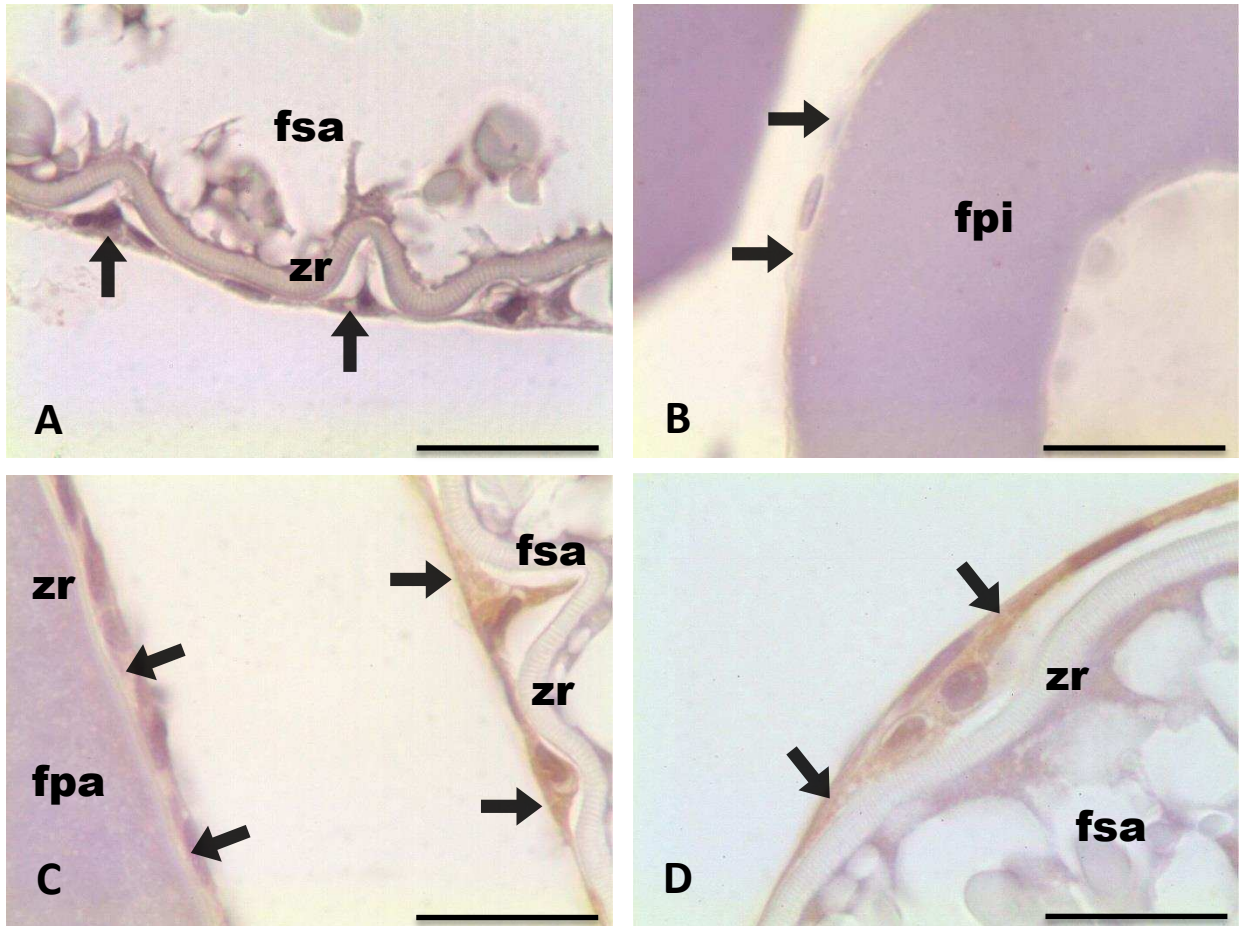


Figura 2. Imunomarcção para caspase 3 ao longo do desenvolvimento folicular em *A. bimaculatus*. **A:** Imagem do controle negativo para caspase 3 (**setas**). **B:** Ausência de marcação para caspase 3 (**setas**) em folículo em desenvolvimento primário inicial (**fpi**). **C e D:** Marcação positiva para caspase 3 (**setas**) em folículo em desenvolvimento secundário avançado (**fsa**) e ausente (**setas**) em folículo desenvolvimento primário avançado (**fpa**). **zr:** zona radiata; **fsa:** folículo secundário avançado. **Barras:** 20 μ m

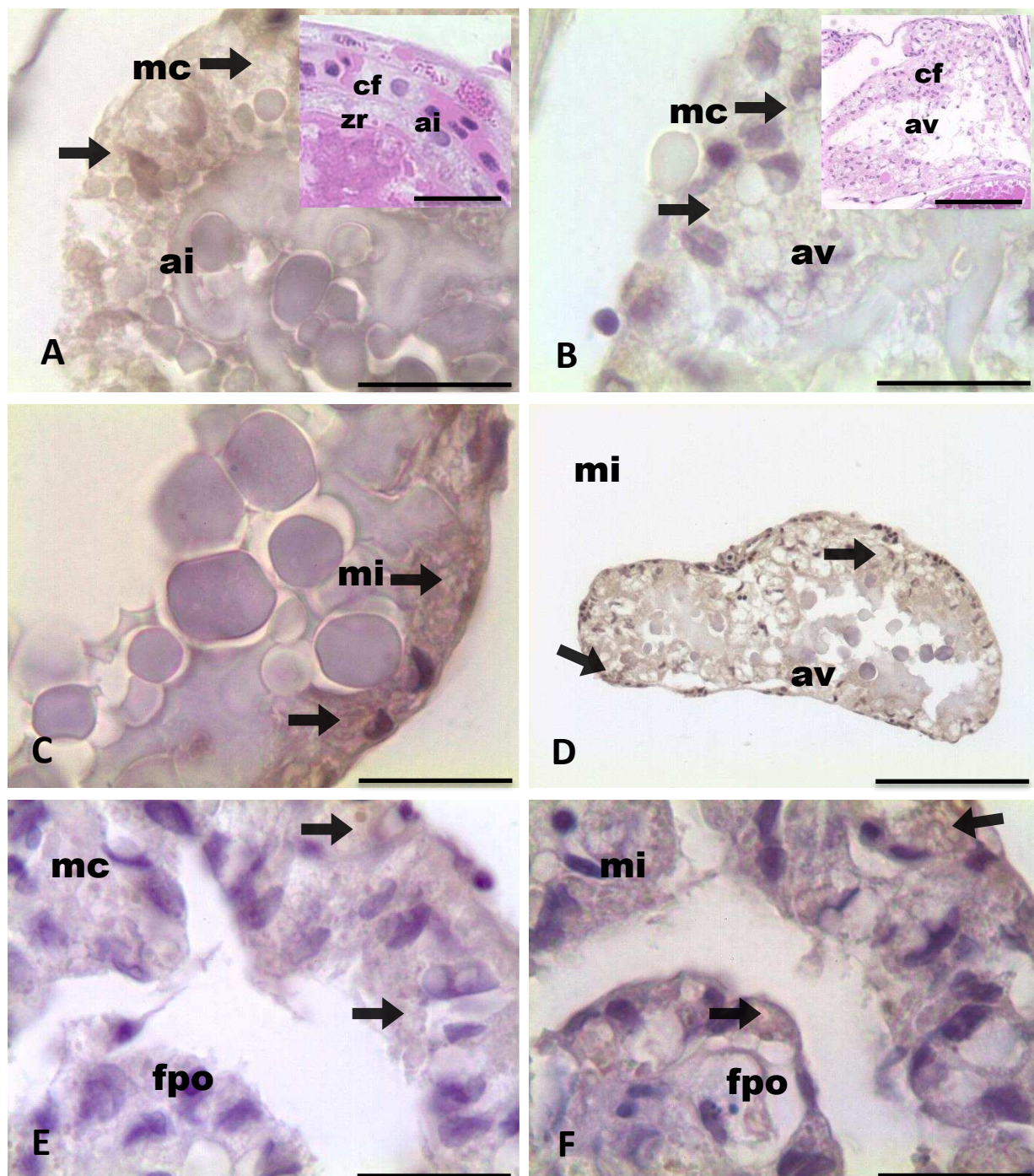


Figura 3. Imunomarcção para colágeno tipo IV e integrina $\beta 1$ de atresia e folículos pós-ovulatório em *A. bimaculatus*. **A e C:** Folículo secundário em atresia inicial (**ai**) caracterizando a presença da zona radiata (**zr**) e início da desorganização da marcação para colágeno tipo IV (**mc**) e integrina $\beta 1$ (**mi**) no complexo folicular (**setas**). **B e D:** Imunomarcção menos intensa do que na etapa anterior em atresia avançada, caracterizando a desorganização e espalhamento do colágeno tipo IV (**mc**) e integrina $\beta 1$ (**mi**) no citoplasma (**setas**). **E e F:** Folículo pós-ovulatório (**fpo**) caracterizando a desorganização e espalhamento do colágeno tipo IV (**mc**) e integrina $\beta 1$ (**mi**) entre as células foliculares (**setas**). **Encartes:** **A e B:** Atresia inicial (**ai**) e atresia avançada (**av**); célula folicular (**cf**); zona radiata (**zr**). **Encartes:** **A e B** corados com hematoxilina/eosina. **Barras:** **A, B, C, E e F** (20 μm); **D** (200 μm); **encartes:** **A** (25 μm) e **B** (100 μm).

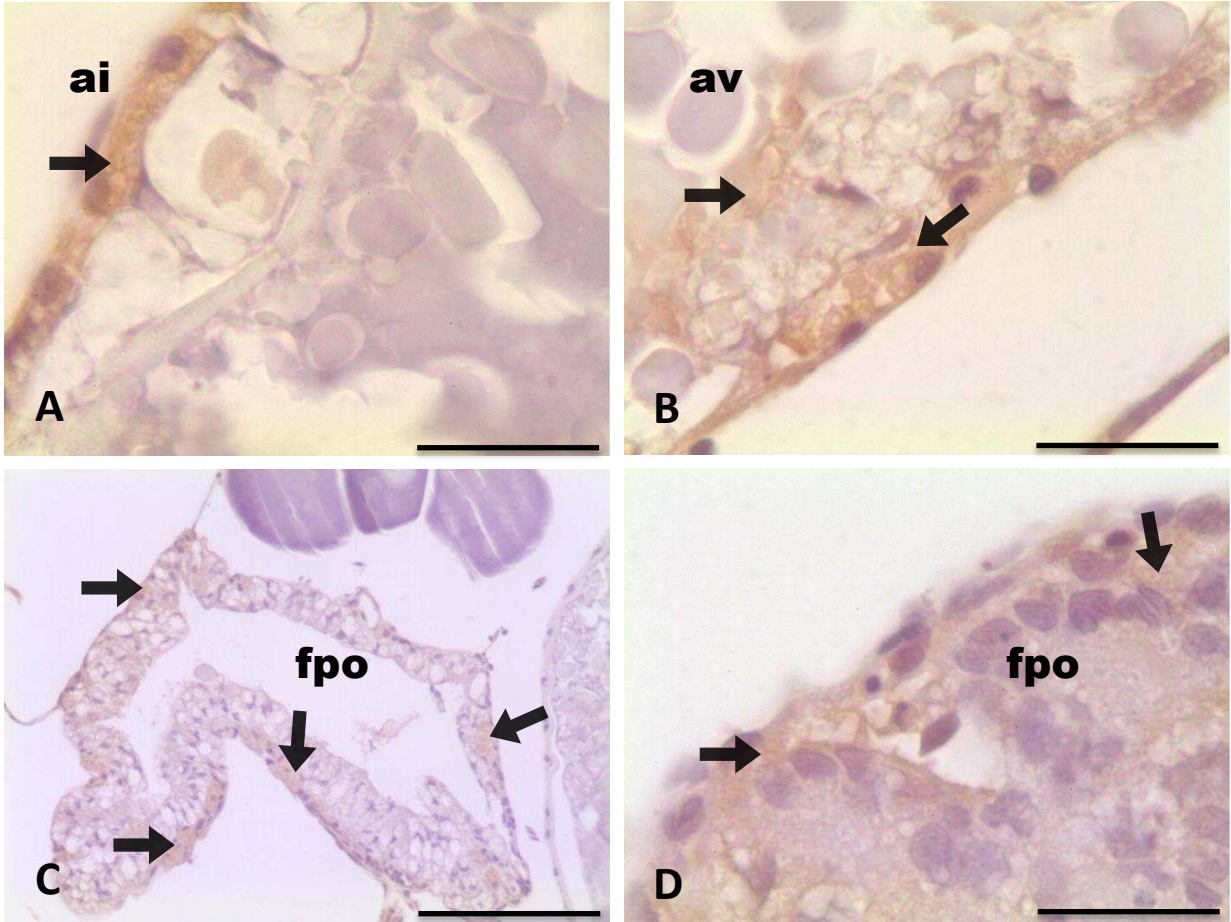


Figura 4. Imunomarcção para caspase 3 em atresia folicular e folículos pós-ovulatórios em *A. bimaculatus*. **A e B:** Imunomarcção em atresia inicial (**ai**) e atresia avançada (**av**), caracterizando a presença de marcação positiva para caspase 3 (**setas**). **C e D:** Imunomarcção positiva para caspase 3 (**setas**) nas células dos folículos pós-ovulatórios (**fpo**). **Barras:** A, B e D (20 μ m); C (200 μ m).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS). **NBR 15088 – Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com peixes**. 2ª ed: versão corrigida 31/03/2006. p.19. 2007.
- ALI, S. M.; BOWES, G. W.; COHEN, D. B. Endosulfan. **Toxic Substances Control Program**, California State Water Resources Control Board (SWRCB), Sacramento, CA. Special Projects Report No. 84-7SP, 1984.
- BALLESTEROS, M. L.; BIANCHI, G. E.; CARRANZA, M.; BISTONI, M. A. Endosulfan acute toxicity and histomorphological alterations in *Jenynsia multidentata* Anablepidae, Cyprinodontiformes). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 42(4):351-357, 2007.
- BARBIERI, G.; M. V. R. SANTOS & J. M. SANTOS. Época de reprodução e relação peso corporal/comprimento padrão de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 17:1057-1065, 1982.
- BAZZOLI, N.; RIZZO, E. A comparative cytological and cytochemical study of the oogenesis in tem Brazilian teleost fish species. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 4:399-410, 1990.
- BEGOVAC, P. C.; WALLACE, R. A. Stages of oocyte development in the pipefish, *Syngnathus scovelli*. **Journal of Morphology**, 197:353-369, 1988.
- BERKHOLTZ, C. B.; LAI, B. E.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Distribution of extracellular matrix proteins type I collagen, type IV collagen, fibronectin, and laminin in mouse folliculogenesis. **Histochem Cell Biology**, 126:583-592, 2006.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, 64:1793-1800, 2006.
- CENGIZ, E. İ.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of thiodan® on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia Affinis*. **Journal of Environmental Science and Health**, 36:75-85, 2001.
- CHAKRABARTY, S.; RAJAKUMAR, A.; RAGHUVeer, K.; SRIDEVI, P.; MOHANACHARY, A.; PRATHIBHA, Y.; BASHYAM, L.; DUTTA-GUPTA, A.; SENTHILKUMARAN, B. Endosulfan and flutamide, alone and in combination, target ovarian growth in juvenile catfish, *Clarias batrachus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 155(3):491-497, 2012.
- CHATTERJEE, S.; DASMAHAPATRAA, A. K.; GHOSHA, R. Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, 129:265-273, 2001.
- CHATTERJEE, S.; DUTTA, A. B.; GHOSH, R. Impact of carbofuran in the oocyte maturation of catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 32:426-430, 1997.
- CHUN, S. Y.; BILLIG, H.; TILLY, J. L.; FURUTA, J.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A. J. W. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. **Endocrinology**, 1845-1853, 1994.
- CONAMA. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: www.mma.gov.br. Acesso em 12/07/2010.
- DEVERAUX, Q. L.; REED, J. C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. **Genes Development**, 13:239-252, 1999.

- DRUMMOND, C. D.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Postovulatory follicle: a model for experimental studies of programmed cell death or apoptosis in teleosts. **Journal of Experimental Zoology**, 287:176-182, 2000.
- DUTTA, H. M.; DALAL, R. The effect of endosulfan on the ovary of bluegill sunfish: A histopathological study (*Lepomis macrochirus*). **International Journal of Environmental Research**, 2(3): 215-224, 2008.
- DUTTA, H. M.; MAXWELL, L. B. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, *Lepomis macrochirus*. **Environmental Pollution**, 121(1):95-102, 2003.
- EPA. Ambient water quality criteria for endosulfan. United States Environmental Protection Agency. EPA 440/5-80-046. 154p. 1980.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. EU-MRLs Regulation EC 396/2005: regulation (EC) N° 396/2005 of the European Parliament and of the Council. Official Journal of the European Union, p.L70/1-L7016. 2002.
- FROJDMAN, K.; PELLINIEMI, L. J.; VIRTANEN, I. Differential distribution of type IV collagen chains in the developing rat testis and ovary. **Differentiation**, 63:125-130, 1998.
- GLOVER C. N.; PETRI, D.; TOLLEFSEN, K. E.; JØRUM, N.; HANDY, R. D.; BERNTSSEN, M. H. Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. **Aquatic Toxicology**, 84(3): 346-355, 2007.
- GRIER, H. J. Ovarian epithelium and folliculogenesis in the common snook, *Centropomus undecimalis* (Teleostei, Centropomidae). **Journal of Morphology**, 243: 265-281, 2000.
- GRIER, H. J. The germinal epithelium: its dual role in establishing male reproductive classes and understanding the basis for indeterminate egg production in female fishes. **Proceedings of the 53 Annual Gulf and Caribbean Fisheries Institute**, 2002.
- GRIER, H. J.; URIBE, M. C.; PARENTI, L. R. Germinal epithelium, folliculogenesis, and postovulatory follicles in ovaries of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) (Teleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes). **Journal of Morphology**, 268: 293–310, 2007.
- GURAYA, S. S. **The cell and molecular biology of fish oogenesis**. Basel: Ed. Sauer, H. W. Karger. 223p, 1986.
- HAZARIKA, R; DAS M. Toxicological impact of BHC on the ovary of the Air-Breathing Catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 60: 16-21, 1998.
- HENRY, L. KISHIMBA, M. A. Pesticide residues in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and Nile Perch (*Lates niloticus*) from Southern Lake Victoria, Tanzania, **Environmental Pollution**, 140:348-354, 2006.
- HERNAN DA CUÑA, H.; VAZ QUEZ, R. G.; PIOL, N. M.; GUERRERO, V. N.; MAGGESE, M. C.; LO NOSTRO, F. L. Assessment of the acute toxicity of the organ ochlorine pesticide endosulfan in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 74:1065–1073. 2011.
- HUETTENBRENNER, S.; MAIER, S.; LEISSER, C.; POLGAR, D.; STRSSER, S.; GRUSCH, M.; KRUPITZA, G. The evolution of cell death programs as prerequisites of multicellularity. **Mutation Research**, 7705:1-15, 2003.
- HSUEH, A. J; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, 15:707–724, 1994.

- ITAMI, S.; TAMOTSU, S.; SAKAI, A.; YASUDA, K. The roles of thyl and integrin beta 3 in cell adhesion during theca cell layer formation and the effect of follicle-stimulating hormone on thyl and integrin beta 3 localization in mouse ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, 84:986-995, 2011.
- JANZ, D. M.; MCMASTER, M. E.; MUNKITTRICK, K. R.; VAN DER KRAAK, G. Elevated ovarian follicular apoptosis and heat shock protein-70 expression in white sucker exposed to bleached kraft pulp mill effluent. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 147:391-398, 1997.
- JANZ, D. M.; VAN DER KRAAK, G. Suppression of apoptosis by gonadotropin, 17 β -estradiol and epidermal growth factor in trout preovulatory ovarian follicles. **General and Comparative Endocrinology**, 105:186-193, 1997.
- KAPTANER, B.; URAL, G. Apoptosis in postovulatory follicles of *Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811. **J Fish Aquat Sci**, 23:263-267, 2006.
- KATO, Y.; OGIWARA, K.; FUJIMORI, C.; KIMURA, A., TAKAHASHI, T.; TAKAHASHI, T. Expression and localization of collagen type IV α 1 chain in medaka ovary. **Cell and Tissue Research**, 340(3):595-605, 2010.
- LE BELLEGO F.; PISSELET, C.; HUET, C.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Laminin- α 6 β 1 integrin interaction enhances survival and proliferation and modulates steroidogenesis of ovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology**, 172:45-59, 2002.
- LE MENN, F.; CERDÀ, J.; BABIN, P. J. Ultrastructural aspects of the ontogeny and differentiation of ray-finned fish ovarian follicles. 1-37 p. In: Babin, P. J., J. Cerdà & E. Lubzens (Eds.). **The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications**. Dordrecht, Springer, 508p. 2007.
- MAZZONI, R.; MENDONÇA, R. S.; CARAMASCHI, E. P. Reproductive biology of *Astyanax janaeirensis* (Osteichthyes, Characidae) from the Ubatiba River, Maricá, RJ, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, 65:643-649, 2005.
- MAXWELL, L. B.; DUTTA, H. M. Diazinon induced endocrine disruption in bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:21-27, 2005.
- MCARTHUR, M. E.; IRVING-RODGERS, H. F. I.; BYERS, S.; RODGERS, R. J. Identification and immunolocalisation of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, 63:913-924, 2000.
- MELO, F. C. S. A.; MALDONADO, I. R. S. C.; BENJAMIN, L. A.; MATTA, S. L. P. Biologia reprodutiva de fêmeas de lambari-prata (*Astyanax scabripinnis*) (Characidae, Tetragonopterinae) em tanques de piscicultura. **Revista Ceres**, 52:811-829, 2005.
- MIRANDA, A. C. L. **Reprodução de *Astyanax bimaculatus lacustris* em viveiros e estudo histológico e ultra-estrutural da atresia folicular de *Astyanax bimaculatus lacustris* e *Leporinus reinhardti* em gaiolas de aqüicultura**. UFMG, Belo Horizonte, 1996. 138 p. (Dissertação, Mestrado).
- MIRANDA, A. C. L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Ovarian follicular atresia in two teleost species: a histological and ultrastructural study. **Tissue and Cell**, 31: 480-488, 1999.
- MOLINA, D. Anvisa baixa resolução proibindo agrotóxico Endosulfan a partir de 2013. Disponível em: <http://amarnatureza.org.br/site/anvisa-baixa-resolucao-proibindo-agrotoxico-endossulfan-a-partir-de-2013,67995/>. Acessado em: 20/12/2010.
- MUNOZ, M.; CASADEVALL, M.; BONET S. The ovarian morphology of *Scorpaena notata* shows a specialized mode of oviparity. **Journal of Fish Biology**, 61:877-887, 2002

- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W. S., RANDALL, D. J.; BRETT, J. R. **Fish physiology, Reproduction Part. A**, New York: Academic Press. 9:223-275, 1983.
- PEREIRA, V. M.; BORTOLOTO, J. W.; KIST L. W.; AZEVEDO, M. B.; FRITSCH, R. S.; OLIVEIRA, R. D. A. L.; PEREIRA, T. C.; BONAN, C. D.; VIANNA, M. R.; BOGO, M. R. Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Neurotoxicology**, 33(3):469-75, 2012.
- RODGERS, H. F.; IRVINE, C. M.; VAN WEZEL, I. L.; LAVRANOS, T. C.; LUCK, M. L.; SADO, Y.; NINOMIYA, Y.; RODGERS, R. J. Distribution of the $\alpha 1$ to $\alpha 6$ chains of type IV collagen in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, 59:1334-1341, 1998.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F.; RUSSELL, D. L. Extracellular matrix of the developing ovarian follicle. **Reproduction**, 126:415-424, 2003.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina, PR: Grafmarke, p. 591, 2005.
- SAIDAPUR, S. K. Follicular atresia in the ovaries of non mammalian vertebrates. **International Review of Cytology**, 54:225-244, 1978.
- SANTOS, H. B.; SATO, Y.; MORO, L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Relationship among follicular apoptosis, integrin $\beta 1$ and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. **Cell Tissue Research**, 332:159-170, 2008a.
- SANTOS H. B.; THOME, R. G.; ARANTES, F. P.; SATO Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Ovarian follicular atresia is mediated by heterophagy, autophagy, and apoptosis in *Prochilodus argenteus* and *Leporinus taeniatus* (Teleostei: Characiformes). **Theriogenology**, 70:1449–1460, 2008b.
- SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; BAZZOLI, N.; SATO, Y.; MORO, L. Ovarian regression and apoptosis in the South American teleost *Leporinus taeniatus* Lutken (Characiformes, Anostomidae) from the São Francisco Basin. **Journal of Fish Biology**, 67:1446-1459, 2005.
- SANTOS, H. B.; RIZZO, E.; SATO, Y.; BAZZOLI, N. Apoptosis in the involution of postovulatory follicles of *Leporinus taeniatus* LÜTKEN, 1874 (Pisces: Anostomidae) submitted to the induced spawning. In: **XIX Congress of the Brazilian Society of Microscopy and Microanalysis**. Proceedings. Caxambu, MG, 2003.
- SALVESEN, G. S.; DUCKETT, C. S. AP proteins: blocking the road to death's door. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 3(6):401-10, 2002.
- STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 23p., (Report B 81/86), 1986.
- THOME, R.; SANTOS, H. B.; SATO, Y.; RIZZO, E.; BAZZOLI N. Distribution of laminin b2, collagen type IV, fibronectin and MMP-9 in ovaries of the teleost fish. **Journal of Molecular Histology**, 41:215-224, 2010.
- TYLER, C. R.; SUMPTER, J. P. Oocyte growth and development in teleosts. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 6:287-318, 1996.
- WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M.; PEAKALL, D. B. The fate organic pollutants in individuals and in ecosystems. In: **Principles of Ecotoxicology** (C.H. Walker et al.). 1996. London: Taylor & Francis, p. 67-76.

6. CONCLUSÕES

- A CL_{50} estimada para fêmeas adultas de *Astyanax bimaculatus* em maturação avançada expostas ao Thiodan[®] é de 13,6µg/L com intervalo de confiança de 10,1 a 18,4 µg/L.
- A ação do Thiodan[®] em concentrações subletais não afetou o fígado como um todo, mas locais isolados do parênquima hepático, sendo a maioria alterações de estágio I e II, com dano reparável do tecido hepático.
- As alterações na quantidade de glicogênio hepático no experimento sem aclimação/sem alimentação demonstraram que o Thiodan[®] influenciou na maior mobilização das reservas de glicogênio em função das condições ambientais oferecidas aos animais.
- As alterações ocorridas no núcleo e citoplasma dos hepatócitos demonstram que o Thiodan[®] pode comprometer as funções hepáticas, confirmando que o Thiodan[®] influenciou no metabolismo celular como resposta adaptativa celular.
- Não foram observadas diferenças morfológicas que comprometessem diretamente os estádios de desenvolvimento folicular ovariano, seja no grupo controle ou nos grupos tratados com Thiodan[®].
- Os experimentos com aclimação apresentaram alterações na quantidade de folículos primários e secundários quando comparadas com os peixes sem aclimação, sugerindo que o eixo hipotálamo-hipófise-ovário pode estar sendo afetado.
- Houve maior diâmetro nos folículos vitelogênicos e maior frequência de atresia folicular no experimento com aclimação seguida de exposição ao Thiodan[®], o que sugere mecanismo adaptativo com maiores diâmetros de folículos no meio impactado.

- As médias dos IGS e IHS nos experimentos aclimatados foram menores quando comparadas com os experimentos sem aclimatação, sugerindo que a espécie *A. bimaculatus* previamente aclimatada em aquários pode sofrer comprometimento da reprodução.
- As reações imunohistoquímicas para integrina $\beta 1$, colágeno IV e caspase-3 em folículos atrésicos e folículos pós-ovulatórios sugerem possível relação com a regressão ovariana pós-desova.
- As análises por imunohistoquímica para integrina $\beta 1$, colágeno IV e caspase-3 nas células foliculares ao longo do desenvolvimento folicular demonstraram, qualitativamente, marcação crescente e uniforme ao longo do desenvolvimento folicular, mesmo quando os peixes foram expostos a diferentes concentrações de Thiodan[®], o que caracteriza a integridade das células foliculares e da via apoptótica caspase-3-dependente, que pode estar sendo ativada para futuros processos de regressão folicular.