

SUELLEN SILVA CONDESSA

**TOXICIDADE SUBCRÔNICA EM LAMBARIS *Astyanax aff. bimaculatus*
EXPOSTOS AO ZINCO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, para a obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009**

SUELLEN SILVA CONDESSA

**TOXICIDADE SUBCRÔNICA EM LAMBARIS *Astyanax aff. bimaculatus*
EXPOSTOS AO ZINCO**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Biologia Animal, para obtenção do
título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 30 de outubro de 2009

Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos
(Co-Orientador)

Prof. Juraci Alves de Oliveira
(Co-Orientador)

Prof.^a Juliana Silva Rocha

Prof.^a Ita de Oliveira e Silva

Sérgio Luis Pinto da Matta
(Orientador)

“Um dia a gente aprende...”

Que há diferença, a sutil diferença, entre dar a mão e acorrentar uma alma...

A aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança...

A construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão...

A aceitar que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la...

Que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias...

Que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida...

Que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que as vejamos...

Que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos...

Que não importa aonde já chegou, mas onde está indo, mas se você não sabe para onde está indo, qualquer lugar serve...

Que, ou você controla seus atos ou eles o controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados...

Que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências...

Que paciência requer muita prática. Descubra que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se...

Que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou...

Que há mais dos seus pais em você do que você supunha...

Que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que aprender a perdoar-se a si mesmo...

Que com a mesma severidade com que julga você será em algum momento condenado...

Que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte...

Que o tempo não é algo que possa voltar para trás...

Que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais...

E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!"

(William Shakespeare)

Dedico...

Aos meus pais...

Ao Luis Conrado

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, saúde para que eu chegasse até aqui!

Ao Sérgio da Matta pelo profissionalismo, orientação, confiança depositada em mim e acima de tudo pela amizade nestes anos de convivência que foram essenciais para o meu crescimento, aprendizado e indispensáveis para a realização deste estudo.

Aos co-orientadores, Jorge Dergam e Juraci Alves, pelo profissionalismo, incentivo, amizade e colaboração na execução deste estudo.

Ao professor Laércio Benjamin dos Anjos pela colaboração e sugestões ofertadas ao longo do experimento.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Animal pelo aprendizado adquirido ao longo do curso.

Ao professor Oswaldo Pinto Oliveira Filho pela contribuição e por conceder gentilmente os animais utilizados neste experimento.

Aos Departamentos de Medicina Veterinária, Solos, Biologia Geral e Biologia Vegetal onde foram realizadas as atividades deste experimento, por cederem espaço e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao laboratorista Carlinhos, do laboratório de espectrofotometria de absorção atômica, do Departamento de Solos pelas análises realizadas.

À professora Luzimar, do Departamento de Biologia Vegetal, que gentilmente cedeu espaço e equipamentos necessários para a obtenção de imagens deste estudo.

Ao Alex, técnico do laboratório de Biologia Estrutural, pelos “*helps* nos apuros” nas preparações de material, conhecimento fornecido, amizade e risadas.

Ao Sr. Carlos, técnico do laboratório de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral, pela ajuda durante o processo de toxicologia.

As professoras Juliana Silva Rocha e Ita de Oliveira e Silva que gentilmente aceitaram participar da minha banca de defesa e pelas sugestões ofertadas com o intuito de engrandecer o estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao grupo de pesquisa rio Piracicaba: Daiane, Ana Carolina, Marli, Sérgio da Matta, Juraci Alves, Laércio Benjamin e Jorge Dergam.

Aos meus pais pelo amor incondicional, carinho, incentivo, exemplo de vida, palavras de conforto e pelo PAItrocínio e MÃEtrocínio.

À minha irmã pelo carinho e o incentivo para eu retornar a Viçosa sempre que ia para casa...

Ao meu grande Amor, pela compreensão, amor, fidelidade a mim nestes anos que passamos “separados”... Te Amo!

À Dara pela alegria com que me recebia quando eu chegava em casa.

Aos meus familiares (tias, tios, primos, primas, vó) pela força, orações e incentivo.

As A-M-I-G-A-S (Lu, Lili e Lé) pela força, amizade, confidências, gargalhadas, conselhos, carinho, amor...

À tia Fatinha (Sogrona), José Conrado (Sogão), Lailety (Cunhadinha) e Leo (Cunhadinho) pelo carinho, orações e torcida.

Aos “irmãos” de república (Lolys, Kbeça (Su), Dé, Márcio, Cícero, Thiago, Diogo) pelas risadas, companhias, *helps*, amizade, festinhas, conselhos, desabafos...

Aos Amigos: Marcelle (Celle), Suelen (Susumoura), Suhelen, Moréssio, Cíntia, Eliane, Vanessa Mendes, Sávia pela convivência, carinho e amizade que nem o tempo e a distância conseguiu acabar.

As Amigas queridas, Mica (Michele) e Flor (Marli) pelos conselhos, alegrias e convites para a “vida bandida”.

À Carol, pela dupla dinâmica... Apertos, desesperos e conhecimentos compartilhados. Idas, vindas, “dormidas” na Vet, limpezas de aquários juntamente com o consumo de arsênio, zinco, ácido e excretas dos peixes (ecat!).

Ao Grupo Fantástico: Marli, Michele, Carol... Por TUDO!

Ao GDS pelas gargalhadas, descontração, bons momentos, palhaçadas, conhecimentos e confidências compartilhadas.

Aos Sergetes: Aninha, Carol, Dani, Diane, Diego, Fafa, Ju, Kiki, Letinho, Marli, Maytê, Mônica, Priscila, Ana Teresa e Reggis pelas risadas, amizade, colaboração, conhecimentos compartilhados e incentivos.

Aos “Farelos” Kennim, Alex, Lilian, Claudinha, Fernandinho e Arlete pelos momentos divertidíssimos, almoços no R.U. e conhecimentos compartilhados.

As “Peixeretes”: Carol, Marlizinha, Kikidoidona, Juju, Michele (Mica), Dani, Pâmella, Mirlaine, Karine e Fafa, pela ajuda nos sacrifícios, tornando-os divertidíssimos.

À Maria Regina pela ajuda e conselhos em relação às formatações.

Aos amigos Bôleros, Mari e Jana pelos finais de semana divertidíssimos no Vale do Aço, carinho e apoio.

A todos que participaram de mais uma conquista na minha vida, MUITO OBRIGADA!

BIOGRAFIA

Suellen Silva Condessa, filha de Washington Araújo Condessa e Zilda Parreiras Silva Condessa, nasceu na cidade de Timóteo, Vale do Aço, Minas Gerais, em 21 de setembro de 1984.

Em 2002 iniciou o Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biologia da Conservação pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais – UNILESTEMG, na cidade de Ipatinga, Região do Vale do Aço, Estado de Minas Gerais, graduando-se como Bacharel em dezembro de 2006.

Em março de 2007 iniciou disciplinas como estudante não-vinculado, no Programa de Pós-Graduação em nível de Mestrado, pela Universidade Federal de Viçosa.

Em agosto de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 30 de outubro de 2009.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura. 1. Concentração de zinco nos tecidos de machos de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.....31

CAPÍTULO 2

Figura 1: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* do grupo controle.....47

Figura 2: Valores médios do *Degree of Tissue Change* (DTC) nas brânquias de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.....48

Figura 3: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A.aff.bimaculatus* expostos a concentração de 5 mg L⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....51

Figura 4: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A.aff.bimaculatus* expostos a concentração de 10 mg L⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....53

Figura 5: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A.aff.bimaculatus* expostos a concentração de 15 mg L⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....54

Figura 6: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A.aff.bimaculatus* expostos a concentração de 20 mg L⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....55

Figura 7: Fotomicrografias da organização estrutural do tecido hepático de *A. aff. Bimaculatus* do grupo controle.....57

Figura 8: Valores médios do *Degree of Tissue Change* (DTC) tecido hepático de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.....58

Figura 9: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de *A.aff.bimaculatus* expostos a concentração de 5 mg L⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....60

Figura 10: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 10 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	62
Figura 11: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 15 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	63
Figura 12: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 20 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	64
CAPÍTULO 3	
Figura 1: Fotomicrografias da organização estrutural testicular de <i>A. aff. bimaculatus</i> do grupo controle.....	87
Figura 2: Valores médios do <i>Degree of Tissue Change</i> (DTC) nos testículos de <i>A. aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.....	88
Figura 3: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 5 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	89
Figura 4: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 10 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	91
Figura 5: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 15 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	93
Figura 6: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de <i>A.aff.bimaculatus</i> expostos a concentração de 20 mg L ⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento.....	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela. 1: Biometria corporal de machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> (um grupo controle e quatro tratamentos) em condições de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....	27
Tabela. 2: Percentual da mortalidade de <i>A. aff. bimaculatus</i> durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) ($n = 13$).....	28
Tabela. 3: Concentração de zinco (mg L^{-1}) em tecidos de machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> expostos a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.....	29

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Biometria corporal de machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> (um grupo controle e quatro tratamentos) em condições de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....	45
Tabela. 2: Percentual da mortalidade de <i>A. aff. bimaculatus</i> durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) ($n = 13$).....	46
Tabela 3: Divisão em estágios e percentual da média geral das alterações histopatológicas das brânquias detectadas em machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....	49
Tabela 4: Percentual de alterações histopatológicas das brânquias detectadas em machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....	56
Tabela 5: Divisão em estágios e Percentual da média geral das alterações histopatológicas do tecido hepático detectadas em machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....	58
Tabela 6: Percentual de alterações histopatológicas do tecido hepático detectadas em machos de <i>A. aff. bimaculatus</i> após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....	61

Tabela 7: Percentual da constituição tecidual detectadas no fígado de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....66

Tabela 8: Diâmetro nuclear de hepatócitos e Índices hepatossomático de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....67

CAPÍTULO 3

Tabela 1: Biometria corporal de machos de *A. aff. bimaculatus* (um grupo controle e quatro tratamentos) em condições de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....85

Tabela. 2: Percentual da mortalidade de *A. aff. bimaculatus* durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) ($n = 13$).....86

Tabela 3: Divisão em estágios e percentual da média geral das alterações histopatológicas dos testículos detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....88

Tabela 4: Percentual de alterações histopatológicas dos testículos detectadas em *A. aff. bimaculatus* após exposição a tratamentos com diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) por 30 dias.....90

Tabela 5: Percentual da constituição tecidual detectadas nos testículos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....94

Tabela 6: Índices Gonadossomáticos de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias.....96

ANEXOS

ANEXO A: Índices de qualidade da água avaliados durante o experimento com *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao zinco.....102

Tabela 1: Oxigênio dissolvido ($\text{O}_2 - \text{mg L}^{-1}$), Nitrito (NO^{-2}), dureza total (DT - mg L^{-1} de CaCO_3), amônia tóxica (AT - mg dm^3), condutividade elétrica (CE - mS cm) e pH na água dos aquários durante o período experimental de exposição de *A. aff. bimaculatus* a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1})102

RESUMO

CONDESSA, Suellen Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2009. **Toxicidade subcrônica de lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* expostos ao zinco.** Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Orientadores: Jorge Abdala Dergam e Juraci Alves de Oliveira.

Muitos metais ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e são classificados como poluentes somente quando adicionados pelo homem em quantidades suficientes para produzir efeitos deletérios em organismos. Dentre estes metais já existentes no ambiente aquático pode-se citar o zinco (Zn) que é um elemento essencial para os seres vivos. Em concentrações elevadas, o Zn pode se tornar tóxico aos seres vivos por reduzir os níveis séricos de cobre, causando a diminuição da imunidade. O presente estudo busca analisar a bioacumulação e os efeitos da exposição subcrônica a diferentes concentrações de Zn, na histologia de brânquias, fígado e testículos de indivíduos adultos de lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* para avaliar a potencialidade da espécie como bioindicador de qualidade de água. Foram utilizados 65 lambaris, divididos igualmente em 5 aquários. Foi constituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn na água, totalizando 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1} de Zn, respectivamente, no final do período experimental, de 30 dias. Ao final da exposição, os animais foram anestesiados, eutanasiados, medidos, pesados sendo retirados os ossos, testículos, fígado, brânquias, cabeça e músculo. Amostras dos tecidos coletados foram desidratadas e digeridas para a determinação das concentrações do zinco através do espectrofotômetro de absorção atômica. O restante dos tecidos foi fixado, incluído e seccionado em micrótomo rotativo e corado para confecção de lâminas. Nos grupos em que as dosagens de Zn na água foram de 5 e 10 mg L^{-1} , o acúmulo desse metal foi maior nos testículos, seguido das brânquias, ossos, cabeça e músculos, e nos tratamentos em que as dosagens de Zn na água foram de 15 e 20 mg L^{-1} , o acúmulo desse metal foi maior nas brânquias, seguidas pelos testículos, ossos, músculo e cabeça. Foram qualificadas e quantificadas várias histopatologias nas brânquias, nos testículos e no fígado onde também foram quantificados pontos sobre núcleo e citoplasma de hepatócitos, capilar sinusóide e infiltrados leucocitários, além da determinação do diâmetro nuclear dos hepatócitos e calculados os índices hepatossomáticos. Nos testículos foram quantificados morfometricamente, os pontos coincidentes sobre cisto,

intertúbulo, espermatozóides e líquido seminal. Os resultados revelam que mesmo na concentração mais baixa (considerada como máxima permitida pela legislação ambiental vigente) os níveis experimentais de Zn causaram lesões irreversíveis tanto nas brânquias quanto no fígado de *A. aff. bimaculatus*, comprometendo a função destes tecidos. A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao Zn provocou alterações histopatológicas severas e permanentes nos testículos, levando à redução na produção de espermatozóides, o que pode provocar, no ambiente natural, o declínio da taxa de fecundidade e a extinção local da população. Os resultados apresentados provaram claramente a acumulação crescente do Zn nos diferentes tecidos dos animais em estudo submetidos a uma exposição subcrônica (30 dias). Sendo assim, *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando exposta a concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn, estabelecida pela Resolução CONAMA n° 357 de 17/03/2005 como máximo para água própria para a criação de animais. Portanto, é adequada como bioindicador.

ABSTRACT

CONDESSA, Suellen Silva, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, october, 2009. **Subchronic toxicity in *Astyanax aff. bimaculatus* exposed to zinc.** Advisor: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Advisors: Jorge Abdala Dergam and Juraci Alves de Oliveira.

Many metals occur naturally in aquatic environments and are classified as pollutants only when added by men in sufficient amounts to produce deleterious effects on organisms. Among these metals already existent on the aquatic environment it can be mentioned zinc (Zn) which is an essential element for living beings. In high concentrations, zinc can become toxic to living things by reducing the serum levels of copper, causing an immunity decrease. This study aims to analyze the bioaccumulation and the effects of subchronic exposure to different concentrations of Zn, on the histology of gills, liver and testis of adult individuals of lambaris *Astyanax aff. bimaculatus* to evaluate the potential of the species as bioindicator of water quality. Sixty five lambaris were used, divided equally into five tanks. A control group was made, kept under the same conditions as the treated ones, nevertheless without the metal. Every day was added 0,16, 0,33, 0,5 and 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn in the water, adding up to 5, 10, 15 and 20 mg L^{-1} Zn, respectively, at the end of the experimental period, of 30 days. At the end of exposure, animals were anesthetized, euthanized, weighed, measured and the bones, testis, liver, gills, head and muscle were removed. Collected tissue samples were dried and digested for the determination of zinc concentrations over atomic absorption spectrophotometer. The remaining tissue was fixed, included and sectioned in rotative microtome and stained for producing slides. At the groups where the Zn serum in water were 5 and 10 mg L^{-1} , the accumulation of the metal was higher on the testis, followed by gills, bones, head and muscles, and in the treatments where the Zn serum in water were 15 and 20 mg L^{-1} , the accumulation of the metal was higher on the gills, followed by testis, bones, muscle and head. Various histopathologies were classified and quantified on the gills, testicles and liver which were also measured points over the nucleus and cytoplasm of hepatocytes, sinusoidal capillary and leukocyte infiltrated, beyond the determination of the nuclear diameter of hepatocytes and calculated hepatossomatic indexes. On the testicles were morphometrically quantified, the matching points on cyst, intertubule, sperm and seminal fluid. The results show that even in the lowest concentration (considered as the top allowed by

environmental regulations) experimental levels of Zn caused irreversible damage in both gills and liver of *A. aff. bimaculatus*, compromising the function of these tissues. The exposure of *A. aff. bimaculatus* to Zn caused severe and permanent histopathological changes on the testicles, leading to a reduction on sperm production, which may result, in the natural environment, the decline of fertility rate and the local extinction of the population. The presented results clearly proved the increasing accumulation of Zn on different tissues of animals in study kept down a subchronic exposure (30 days). Thus, *A. aff. bimaculatus* showed itself a susceptible species even when exposed to 5 mg L⁻¹ Zn, established by CONAMA Resolution No. 357, of 17/03/2005 as the maximum for appropriate water for breeding. Therefore, it is suitable as a bioindicator.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	01
TOXIDEZ, METAL PESADO E BIOACUMULAÇÃO.....	01
BIOINDICADORES E BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	02
FÍGADO	04
BRÂNQUIAS	04
REPRODUÇÃO E ESPERMATOGÊNESE EM TELEÓSTEOS	05
<i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i>	06
OBJETIVOS GERAIS	07
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	08
MATERIAL E MÉTODOS.....	09
DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO ZINCO NOS TECIDOS	10
ANÁLISES DAS BRÂNQUIAS.....	10
ANÁLISES DO FÍGADO	11
ANÁLISES DOS TESTÍCULOS	12
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPÍTULO 1	20
BIOACUMULAÇÃO DE ZINCO EM DIFERENTES TECIDOS DE <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA	20
RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO	22
MATERIAL E MÉTODOS	24
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
CAPÍTULO 2	37
MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS E DO FÍGADO DE <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> EXPOSTOS AO ZINCO.....	37
RESUMO.....	37
ABSTRACT.....	38

INTRODUÇÃO	39
MATERIAL E MÉTODOS	41
RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
CAPÍTULO 3	77
MORFOLOGIA TESTICULAR DE <i>Astyanax</i> aff. <i>bimaculatus</i> EXPOSTOS	
AO ZINCO.....	77
RESUMO.....	77
ABSTRACT.....	78
INTRODUÇÃO	79
MATERIAL E MÉTODOS	81
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
CONCLUSÕES GERAIS	101
ANEXOS.....	102

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com a crescente interferência do homem na natureza, observa-se um aumento da carga de efluentes lançados no ar, na água e no solo e, por isso, a poluição e a contaminação do ambiente vêm aumentando. O ecossistema aquático é considerado o mais susceptível à poluição (BERTOLETTI, 1990), a qual está comumente associada à descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (MASON, 1996), podendo ocorrer de forma intencional ou acidental, a partir de fontes naturais ou em decorrência da atividade humana (JOBBLING, 1995).

Para que sejam implementadas medidas visando à redução da toxicidade, é importante identificar as substâncias responsáveis pela toxicidade detectada, assim como as suas fontes geradoras. Os ensaios de toxicidade aguda ou crônica e as análises físico-químicas possibilitam a avaliação das características dos diferentes efluentes gerados (BERTOLETTI; ZAGATTO, 2006) e a adoção de medidas de controle da poluição e prevenção dos danos aos ecossistemas aquáticos (OLIVEIRA FILHO, 2003). O objetivo geral desse tipo de estudo é estabelecer os limites máximos permissíveis para a proteção da vida aquática, conhecidos como critérios e/ou padrões de emissão de efluentes líquidos e de qualidade de águas (BERTOLETTI; ZAGATTO, 2006).

TOXIDEZ, METAL PESADO E BIOACUMULAÇÃO

Metais pesados podem ser perigosos nos níveis registrados no ambiente, pois não são degradados, o que pode acarretar em sua permanente adição ao meio aquático. Conseqüentemente apresentam significativo potencial para bioacumulação na biota aquática, podendo, inclusive, biomagnificar-se ao longo de cadeias alimentares (BURATINI; BRANDELLI, 2006).

Os metais pesados ou metais-traço constituem parte integrante do ambiente e da matéria viva, ocorrendo naturalmente em pequenas concentrações, na ordem de partes por bilhão ou partes por milhão. Entre estes, destacam-se por serem essenciais aos organismos, ainda que em quantidades mínimas, o zinco (Zn), o ferro (Fe), o manganês (Mn), o cobre (Cu), o cobalto (Co) e o molibdênio (Mo). Por outro lado, existem metais como chumbo (Pb), cádmio (Cd) e mercúrio (Hg), que não são essenciais aos organismos e podem alterar o seu desenvolvimento (SILVA, 2005).

Diversos estudos indicam que o Hg, Cd, Pb, Cu, Zn, Co, Mn, Mo, alumínio (Al), arsênio (As), tálio (Tl), cromo (Cr), níquel (Ni), selênio (Se), telúrio (Te), antimônio (Sb), berílio (Be), estanho (Sn), tungstênio (W) e vanádio (V) são os principais metais presentes no

ambiente aquático (SCHLENK; BENSON, 2001). Tais elementos reagem com ligantes difusores, com macromoléculas e com ligantes presentes em membranas o que, muitas vezes, lhes confere as propriedades de bioacumulação, biomagnificação na cadeia alimentar, persistência no ambiente e capacidade de provocar distúrbios nos processos metabólicos dos seres vivos. As bioacumulações e biomagnificações se encarregam de transformar concentrações consideradas normais em concentrações tóxicas para as diferentes espécies da biota e para o homem. A persistência garante os efeitos a longo prazo, mesmo depois de interrompidas as emissões (TAVARES; CARVALHO, 1992). Dependendo da concentração atingida no tecido animal, os metais pesados podem desnaturar proteínas, inativar enzimas, alterar a atividade celular e modificar as membranas celulares prejudicando suas funções, causando a morte celular e a destruição do tecido (JESUS; CARVALHO, 2008). Em peixes o acúmulo de metal pode afetar a reprodução e, tornar os peixes juvenis e adultos mais susceptíveis à predação e/ou menos capazes de tolerar outro agente estressante, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido (MULLER; LLOYD, 1994). Diversas classes de poluentes, incluindo metais, são conhecidas por acentuar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Organismos aquáticos, como peixes, têm desenvolvido uma variedade de mecanismos para se protegerem dos efeitos tóxicos de metais, já que estes podem vir a causar estresse oxidativo, prejudicando a saúde e a sobrevivência desses organismos (ALMEIDA *et al.*, 2002; LIONETTO *et al.*, 2003; OAKES; VAN DER KRAAK, 2003; SIRAJ BASHA; USHA RANI, 2003; DAUTREMEPUITS *et al.*, 2004). Parte das defesas celulares envolve a participação de enzimas antioxidantes, como a dismutase do superóxido (SOD) e a catalase (CAT), que atuam contra a toxicidade originada por formas ativas de oxigênio. A SOD tem por função transformar o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A partir desta reação, a CAT atua decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, que são produtos não tóxicos à célula (ROMEO *et al.*, 2000; SIRAJ BASHA; USHA RANI, 2003; HO, 2004; AVCI *et al.*, 2005).

BIOINDICADORES E BIOMARCADORES DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas vem crescendo nas últimas décadas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005). Bioindicadores são definidos como espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (ADAMS, 2002). Os biomarcadores constituem uma abordagem eficiente nos estudos de avaliação de risco e impacto ambiental, pois detectam de

forma precoce os efeitos reais que estão ocorrendo aos seres vivos em situações de exposição a ambientes poluídos (FREIRE *et al.*, 2008).

É expressivo o número de trabalhos onde peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (OVERSTREET, 1988; TEH *et al.*, 1997; SCHWAIGER *et al.*, 1997; GUNDERSEN *et al.*, 2000; PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004). Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (VAZZOLER, 1993; LOWE-MCCONNELL, 1999), servem de alimento para diversos animais dentro da cadeia alimentar; são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta usual em muitos países e, em alguns constituem a principal fonte de proteínas da população. Além disso, economicamente os peixes representam a principal fonte de renda para comunidades ribeirinhas e litorâneas (SILVA FILHO *et al.*, 2000). Os efeitos dos poluentes sobre os peixes podem resultar em acentuada mortalidade, no caso de poluição severa, ou em morte de alguns indivíduos quando a exposição é prolongada, porém sob condições menos drásticas. Além disso, mesmo que a exposição não seja letal, a poluição pode prejudicar a habilidade dos peixes em realizar suas funções fisiológicas (RAND; PETROCELLI, 1985; JOBLING, 1995). Em estudos de toxicidade, biomarcadores em nível bioquímico, fisiológico e histológico têm sido muito utilizados para avaliar as respostas aos estressores, permitindo a avaliação mais rápida das alterações nos organismos (MAYER *et al.*, 1992). Os biomarcadores histopatológicos são utilizados para documentar e quantificar tanto a exposição quanto o efeito dos poluentes (WINKALER *et al.*, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; VEIGA *et al.*, 2002; MELETTI *et al.*, 2003) e são considerados mais sensíveis que os parâmetros relacionados apenas com o crescimento ou reprodução do indivíduo (TEH *et al.*, 1997).

Características histopatológicas específicas de cada organismo resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo que podem levar à formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON *et al.*, 1992). Biomarcadores histopatológicos são utilizados em estudos de campo para avaliar o efeito tóxico dos poluentes no ambiente aquático e têm a capacidade de diferenciar lesões nos órgãos, induzidas por doenças e outros fatores do ambiente, daquelas provocadas pela exposição aos poluentes (SCHWAIGER *et al.*, 1997).

Uma vez no ambiente aquático, os poluentes podem ser absorvidos pelos teleósteos principalmente por meio da alimentação e das brânquias, e acumular-se nas brânquias, no fígado, nos rins, no intestino e nos músculos. Parte desses poluentes é transferida e biotransformada por meio de enzimas, tornando-se, então, hidrossolúvel e passível de ser

excretada pela pele, através do muco, pelo intestino, através das fezes, pelos rins, através da urina, ou pelas brânquias (HEATH, 1987).

FÍGADO

O fígado de peixes teleósteos representa um volume considerável em relação ao corpo. É composto por dois lobos: o lobo direito, que está ao lado da vesícula biliar, e o lobo esquerdo, próximo ao baço. É de cor marrom nas espécies carnívoras, e marrom claro nas espécies herbívoras (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). É composto de células parenquimatosas (células hepáticas ou hepatócitos) e uma rede de fibras cuja função é de suportar os elementos celulares. A superfície do fígado é envolvida por membrana serosa, e alguns septos do tecido conjuntivo dessa cápsula se estendem para o interior do parênquima (GARTNER; HIATT, 2007). Além dos hepatócitos, são encontradas no fígado as células epiteliais dos ductos biliares, os macrófagos, as células sanguíneas e as células endoteliais (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

As principais células do fígado, os hepatócitos, são poliédricas com um ou dois núcleos grandes, esféricos e centralmente localizados, com nucléolo evidente, e o citoplasma com granulações e aspecto vacuolizado. O citoplasma dos hepatócitos apresenta aspecto variável, dependendo do estado nutricional do indivíduo. Quando este se encontra bem alimentado, os hepatócitos armazenam quantidades significativas de glicogênio e processam grandes quantidades de lipídios (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). As células hepáticas têm várias funções vitais além da secreção da bile e metabolismo de xenobióticos. Elas apresentam importante papel no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos e, além disso, estão envolvidas na hematopoese e na produção de anticorpos durante o período larval dos peixes (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; PARIS-PALACIOS *et al.*, 2000).

BRÂNQUIAS

Na maioria dos teleósteos são encontrados quatro arcos branquiais, situados de cada lado da cavidade bucal. Cada arco branquial é formado por um eixo cartilaginoso, ou ósseo, e uma fileira dupla de filamentos branquiais achatados dorso-ventralmente. Esses filamentos subdividem-se em lamelas branquiais, que se encontram dispostas perpendicularmente ao eixo das brânquias. Os filamentos (ou lamelas) branquiais possuem um epitélio estratificado, constituído por diversos tipos de células, entre as quais é possível distinguir as células de cloro, as mucosas e as pavimentosas. O arco branquial possui um seio venoso central, que se segmenta em eixos vasculares que suprem as lamelas. As lamelas representam projeções

teciduais acima da superfície externa do epitélio filamentar (ou lamelar). Desse modo, as lamelas são constituídas centralmente por um eixo vascular recoberto por um epitélio composto por células pavimentosas de revestimento e indiferenciadas. Esse epitélio assenta-se na lâmina basal de células endoteliais modificadas (células pilares) que suportam e delimitam o compartimento sanguíneo lamelar (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007; GENTEN *et al.*, 2009).

As brânquias têm sítios de ligação que promovem suas funções regulares, os quais podem se ligar às substâncias tóxicas, provocando respostas mecânicas e efeitos tóxicos aos organismos (HOLLIS; PLAYLE, 1997). As alterações do tecido são precedidas por respostas bioquímicas e fisiológicas, e uma vez que os danos são detectados, os efeitos adversos nos organismos são incontestáveis (EWALD, 1995). A detecção destas alterações quando os organismos são expostos a determinadas condições ambientais, confirmam a degradação daquele ambiente (FRACÁCIO *et al.*, 2003).

REPRODUÇÃO E ESPERMATOGÊNESE EM TELEÓSTEOS

A etapa mais importante do ciclo de vida dos peixes e também de sua dinâmica populacional, é a reprodução. Os recursos utilizados pelos indivíduos no período reprodutivo são fundamentais para o sucesso dos teleósteos e, conseqüentemente, da população como um todo (WOOTTON, 1984). Aspectos de reprodução de peixes, baseados na maturação gonadal e na utilização de indicadores quantitativos, têm servido de parâmetro para o entendimento ecológico do papel desempenhado pelas espécies de um ambiente aquático. O índice gonadossomático é, para a maioria das espécies de teleósteos, utilizado como indicador quantitativo na avaliação do período de reprodução da espécie (VAZZOLER, 1993). A estratégia reprodutiva é o padrão geral reprodutivo adotado por uma espécie. Em razão da alta diversidade de espécies e da ocupação dos mais variados tipos de ambientes, os peixes desenvolveram imensa variedade de estratégias reprodutivas (BREder; ROSEN, 1966; WALLACE; SELMAN, 1981; VAZZOLER, 1993; COWARD *et al.*, 2002).

A maioria dos teleósteos (peixes da classe Actinopterygii), dentre os quais estão os peixes brasileiros de água doce utilizados em aquicultura, são espécies ovíparas que liberam os ovócitos no meio aquático onde são fertilizados pelos espermatozóides (peixes de fertilização externa). Quanto ao desenvolvimento dos embriões, estes independem do auxílio dos pais, embora, em alguns casos, ambos os progenitores tomem conta da prole. Além disso, os embriões contam com o suporte dos nutrientes do vitelo ovocitário para seu desenvolvimento (GODINHO, 2007).

A reprodução dos peixes é cíclica, e compreende um período de repouso intercalado por períodos de atividade sexual, os quais terminam com o surgimento de nova prole. O processo espermatogênico pode ocorrer de duas maneiras, conforme a distribuição das espermatogônias ao longo do túbulo seminífero: tipo espermatogonial irrestrito, no qual as espermatogônias estão distribuídas ao longo do túbulo, e o tipo espermatogonial restrito, onde as espermatogônias estão restritas à porção distal do túbulo seminífero, próxima à albugínea testicular (GRIER *et al.*, 1980; GRIER, 1981). Nos teleósteos, a espermatogênese desenvolve-se em cistos que se formam quando as células de Sertoli e uma espermatogônia primária se associam (MATTA *et al.*, 2009). Durante este processo, a espermatogônia primária é circundada por células de Sertoli, as quais, neste estágio, são pouco desenvolvidas, assumindo aspecto de células epiteliais escamosas com o núcleo ovóide ou alongado e com a cromatina em diferentes graus de condensação (PUDNEY, 1995). Em várias espécies de teleósteos é possível a observação de um nucléolo proeminente em núcleos das células de Sertoli, que muitas vezes apresentam-se com aspecto triangular (MATTA *et al.*, 2002).

O processo espermatogênico dos teleósteos assemelha-se ao de outros vertebrados. Assim, a espermatogônia primária divide-se e origina espermatogônias secundárias que, depois de várias divisões mitóticas espécie-específicas, diferenciam-se em espermatócitos primários. Estes entram em divisão meiótica formando os espermatócitos secundários, células haplóides que sofrem a segunda divisão meiótica para produzir células, as espermatídes. Estas passam pela fase espermiogênica caracterizada por marcantes alterações morfológicas, principalmente relacionadas com a condensação nuclear e a formação da peça intermediária e do flagelo, originando os espermatozóides que são células altamente especializadas e equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (MIURA, 1999).

Astyanax aff. bimaculatus

O lambari, *Astyanax aff. bimaculatus*, pertence à família Characidae, que engloba a maior parte dos peixes de água doce do Brasil. As espécies do gênero *Astyanax* são consideradas como *Incertae Sedis* dentro dos Characidae (LIMA *et al.*, 2003), diversas de suas populações apresentam, aparentemente, pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental, sugerindo um grupo em especiação. São considerados como elementos importantes para a manutenção do equilíbrio ecológico e apresentam o mesmo ciclo reprodutivo dos peixes de "piracema", realizando curtas migrações ascendentes na época de cheias, o que lhes proporciona o estímulo necessário para a reprodução (GURGEL, 2004). Dentro de *Astyanax*, os dois complexos de espécies com maior distribuição são os lambaris-

de-rabo-vermelho *Astyanax fasciatus*, e os lambaris-do-rabo-amarelo, *A. aff. bimaculatus* (ARAÚJO; SIMONI, 1997), conhecidos, também, por tambiú, piabas no Nordeste e matupiris no Norte do Brasil. Os dois complexos estão distribuídos desde o Nordeste brasileiro até a bacia do Prata (AGOSTINHO *et al.*, 1982; BARBIERI *et al.*, 1982). São apreciados na pesca esportiva e têm importante função como larvófagos, alimentando-se, por exemplo, de larvas de pernilongos. Na cadeia alimentar dos sistemas ecológicos em que ocorrem, são importantes na base trófica para as espécies carnívoras (MORAIS *et al.*, 2007).

O *A. aff. bimaculatus* é um peixe de pequeno porte, atingindo cerca de 20 cm de comprimento e peso de até 40 g. O corpo é alto, o dorso é castanho-escuro, com uma mancha umeral negra ovalada de limites bem distintos. Apresenta uma faixa lateral prateada ou escura, ao logo do flanco, até a mancha no fim do pedúnculo caudal. As nadadeiras ventrais e a anal são amarelas (VAZ *et al.*, 2000). Muito ativo, move-se em cardumes e pode realizar curtas migrações ascendentes na época das cheias, o que lhe proporciona o estímulo necessário para a reprodução (VAZ *et al.*, 2000). Dependendo das condições ambientais, pode apresentar desova parcelada ou total (IHERING; AZEVEDO 1934; NOMURA 1975; GARUTTI 1989; GENNARI FILHO; BRAGA 1996). As estimativas para o tamanho de maturação sexual da espécie variam de 7,8 a 10,4 cm de comprimento total (NOMURA 1975; AGOSTINHO *et al.*, 1984; SANTOS *et al.*, 1991). A idade da primeira maturação gonadal em cativeiro ocorre aos quatro meses (SILVA *et al.*, 1996).

No rio Mogi-Guaçu, em São Paulo, espécie *A. aff. bimaculatus* foi definida como onívora, em estudos realizados no rio com predominância de consumo de restos de vegetais superiores (NOMURA, 1975). Porém, a espécie pode apresentar tendência à herbivoria-insetivoria, refletindo uma característica oportunista (SILVA, 1998). Microcrustáceos constituem-se, também, num recurso relativamente expressivo na sua alimentação (GASPAR DA LUZ, 1996).

2. OBJETIVOS

GERAL

Objetivou-se estudar a bioacumulação de Zn e os efeitos da exposição subcrônica de diferentes concentrações deste metal, na histologia de brânquias, fígado e testículo de indivíduos adultos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*) para avaliar o potencial da espécie como bioindicador de qualidade de água.

ESPECÍFICOS

- a) determinar a concentração de Zn absorvida em brânquias, osso, músculo, cabeça, testículos e fígado, a partir de diferentes concentrações de Zn na água;
- b) avaliar, qualitativamente e quantitativamente, a histopatologia de brânquias, fígado e testículo causadas pela exposição crônica ao Zn na água;
- c) avaliar o uso de características histopatológicas dos tecidos branquial, hepático e testicular como biomarcador da concentração de Zn.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), protocolo nº 95806/2009. Foram utilizados 65 machos de *A. aff. bimaculatus*, procedentes da Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, localizada na cidade de Viçosa-MG.

A pesquisa foi desenvolvida nos seguintes Laboratórios: Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária; Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral; Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal; Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, todos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados cinco aquários de vidro, cada um com capacidade de 150 L de água livre de cloro (por evaporação), mantendo-se 13 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 l/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos aquários era sifonado para eliminar restos de matéria orgânica e, imediatamente, substituído, mantendo-se as mesmas características iniciais. A qualidade da água foi monitorada a cada sete dias, medindo-se: o oxigênio dissolvido, a amônia tóxica, a dureza total e o nitrito através de *kits* colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH, pelo medidor de pH digital de bancada (Tracom 10) e a condutividade elétrica, pelo condutivímetro digital de bancada (Tonka CD 820). Foram coletadas amostras de água a cada sete dias para determinação das concentrações de Zn através do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

A temperatura foi controlada (26 ± 1 °C) (FISHBASE, 2009) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W). O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro, controlado por temporizador. Os peixes tiveram alimentação diária *ad libitum* ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida duas vezes ao dia, às 8 e às 17 horas. Essa ração apresenta-se em grânulos de 4 mm e, devido à incompatibilidade com o tamanho da cavidade bucal dos peixes, foi triturada e peneirada, utilizando-se peneira com malha de 1 mm.

A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn na água, fornecido na forma de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, nº 1.08883.1000), totalizando 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1} de Zn no final do período experimental, que foi de 30 dias. Foi instituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem a adição do metal no água. Cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 13 repetições.

A partir do momento que foi observada mortalidade dos animais, no 15º dia experimental, foram feitas observações a cada hora para retirada dos animais mortos nesse intervalo. Estes animais foram submetidos aos mesmos procedimentos daqueles que sobreviveram até o final do tempo de exposição. Ao final do período experimental, os animais foram previamente anestesiados com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia, sendo então eutanasiados por secção da medula espinhal, na região occipital.

De cada exemplar foram registrados os seguintes dados: comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG), peso do fígado (PF), peso das brânquias (PB), peso dos fragmentos de músculos (PM), peso da cabeça (PCa) e peso dos fragmentos dos ossos (PO). Os pesos foram obtidos utilizando-se uma balança analítica digital com precisão de 0.0001 g (Scientech, AS 210). Para a medição, utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de 0,02 mm e, para a retirada dos tecidos, tesoura e bisturi cirúrgico. Para a histologia das brânquias foram utilizados fragmentos da região mediana do segundo arco braquial, e para a histologia do fígado e dos testículos, as regiões medianas dos respectivos órgãos.

Determinação da concentração do zinco nos peixes

Amostras de fragmentos de osso, testículos, fígado, brânquias, cabeça e músculo, após a pesagem, foram mantidas em estufa, a 70 °C, até alcançarem peso seco constante. As amostras pré-secas foram acondicionadas em Erlenmeyer de 25 mL, adicionando-se então 1,5 mL de HNO₃ concentrado, 0,5 mL de HClO₄ 70%, 2 gotas de água oxigenada 30% e 1 gota de querosene para reduzir a formação de espuma. A temperatura do bloco digestor foi aumentada gradualmente até atingir 90 °C, de forma a proporcionar a digestão completa. Após diluição do material digerido, procedeu-se à determinação das concentrações dos elementos minerais através do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

Análises das brânquias

Após a incisão na região opercular, as brânquias foram retiradas e fragmentos do segundo arco braquial, região mediana, foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas sendo depois transferidos para álcool 70%. Os fragmentos branquiais foram colocados em série etanólica crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Após a inclusão, foram

feitas secções semi-seriadas de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck) e analisadas sob microscopia de luz (microscópio Olympus BX-50). As imagens digitais foram capturadas por meio de fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal (UFV) e processadas utilizando-se o *software* Adobe Photoshop CS2®.

Para as análises histopatológicas das brânquias foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias utilizando dez campos/animal: hiperplasia, redução de lamelas secundárias, fusão das lamelas primárias e secundárias, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, deleção de epitélio lamelar primário e secundário, ruptura de membrana, produção excessiva de muco, espessamento lamelar, vacuolização lamelar, destacamento de epitélio, edema, redução e aumento do espaço interlamelar, deformação da lamela primária e presença de tecido muscular. Se a patologia estivesse presente em pelo menos um dos campos visualizados, esta era considerada presente no animal. Por último, foi feita uma relação entre os animais que apresentaram patologia e o total presente no tratamento (n=13), expressando-se o resultado em porcentagem.

Análises do fígado

Após a incisão longitudinal ventral da parede celomática com tesoura cirúrgica, o fígado foi removido e fragmentos desse órgão foram retirados seguindo o mesmo procedimento histológico descrito para as brânquias. Após a inclusão, foram feitas secções semi-seriadas de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com hematoxilina de Mayer e floxina B, montadas com Entellan® (Merck), e analisadas sob microscopia de luz (microscópio Olympus BX-50). As imagens digitais foram capturadas por meio de fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal (UFV) e processadas utilizando-se o *software* Adobe Photoshop CS2®.

Nas análises histopatológicas do fígado, foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias utilizando-se dez campos/animal: deslocamento de núcleo do hepatócito, necrose, desarranjo da estrutura cordonal, infiltrado leucocitário, vacuolização de hepatócito, hepatócito com núcleo picnótico, citoplasma com granulação densa, degeneração nuclear, degeneração citoplasmática, proliferação e inchaço sinusóide, hipertrofia nuclear, hipertrofia celular e congestão vascular. Se a patologia estivesse presente em pelo menos um dos campos visualizados, esta era considerada presente no animal. Ao final, foi feita uma relação entre os

animais que apresentaram patologia e o total presente no tratamento (n=13), expressando-se o resultado em porcentagem.

Morfometricamente foram quantificados, com auxílio do programa para análise de imagem Image Pro Plus, pontos sobre núcleo e citoplasma de hepatócitos, sobre capilares sinusóides e sobre infiltrados leucocitários, totalizando 2.660 pontos/animal. Para determinação do diâmetro nuclear dos hepatócitos, foram medidos 30 núcleos/animal com auxílio do programa para análise de imagem Image Pro Plus.

Para obter o grau de desenvolvimento do fígado em relação ao peso corporal foi calculado o índice hepatossomático (IHS) mediante a fórmula: $IHS_1 = PF/PC \times 100$. Para verificar a influência do fígado sobre o índice hepatossomático, foi utilizada a fórmula $IHS_2 = PF / (PC - PF) \times 100$, em que PF = Peso do Fígado e PC = Peso Corporal.

Os resultados das variações dos constituintes do tecido hepático, índice hepatossomático e diâmetros nucleares de hepatócitos foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de Newman-Keuls, com valor de $p \geq 0,05$. Os resultados das histopatologias foram analisados de forma descritiva.

Análises dos testículos

Após a incisão longitudinal ventral da parede celomática com tesoura cirúrgica, os testículos foram removidos, e fragmentos testiculares da região mediana seguiram o mesmo procedimento histológico descrito para as brânquias. Após a inclusão, foram feitas secções seriadas de 3 μ m de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, montadas com Entellan® (Merck), e analisadas sob microscopia de luz (microscópio Olympus BX-50). As imagens digitais foram capturadas por meio de fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal (UFV), e processadas utilizando-se o *software* Adobe Photoshop CS2®.

As gônadas foram analisadas morfológica e morfometricamente de acordo com MATTA *et al.* (2002).

Para as análises histológicas do testículo foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias, utilizando-se dez campos/animal: ruptura de cisto, deslocamento da parede dos túbulos, retardo do desenvolvimento gonadal, agrupamento celular, núcleo picnótico, vacuolização, muco, degeneração, deslocamento de cisto, destruição do tecido intertubular, desorganização dos cistos e destruição dos cistos. Se a patologia estivesse presente em pelo menos um dos campos visualizados, esta era considerada presente no

animal. Ao final, foi feita uma relação entre os animais que apresentaram patologia e o total presente no tratamento (n=13), expressando-se o resultado em porcentagem.

Morfometricamente foram quantificados pontos coincidentes sobre cisto, intertúbulo, espermatozóides e líquido seminal através do programa para análise de imagem Image Pro Plus, totalizando 2.660 pontos por animal, sendo os resultados expressos em porcentagem.

Para obter a relação entre o peso corporal e o peso das gônadas foi calculado o índice gonadossomático (IGS) mediante a fórmula: $IGS_1 = PG/PC \times 100$. Para estimar a influência do peso dos testículos sobre o IGS, foi utilizada a fórmula $IGS_2 = PG / (PC - PG) \times 100$, em que PG = Peso das gônadas e PC = Peso Corporal.

Os resultados dos constituintes do tecido testicular e índice gonadossomático foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de Newman-Keuls com valor de $p \geq 0,05$. Os resultados das histopatologias foram analisados de forma descritiva.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. (Eds). **Biological indicators of aquatic ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, USA, 2002. 600p.

AGOSTINHO, C.A.; MOLINARI, S.L.; AGOSTINHO, A.A. Ciclo reprodutivo de machos do lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes-Characidae) no rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Ciência e Cultura**, 34:566, 1982.

AGOSTINHO, C.A.; MOLINARI, S.L.; AGOSTINHO, A.A. Ciclo reprodutivo e primeira maturação de fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) (L) (Osteichthyes - Characidae) do Rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, 44:31-6, 1984.

ALMEIDA, J.A.; DINIZ, Y.S.; MARQUES, S.F.G.; FAINE, L.A.; RIBAS, B.O.; BURNEIKO, R.C.; NOVELLI, E.L.B. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. **Environment International**, 27:673-679, 2002.

ARAÚJO, F.G.; SIMONI, M.R.F. Relação peso comprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus parahybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, 40:453-458, 1997.

AVCI, A.; KAÇMAZ, M.; DURAK, I. Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:101-105, 2005.

BARBIERI, G.; HARTZ, S.M.; VERANI, J.R. Época de reprodução e peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 17: 1057-65, 1982.

BARCAROLLI, I.F.; MARTINEZ, C.B.R. Effects of aluminium in acidic water on hematological and physiological parameters of the neotropical fish *Leporinus macrocephalus* (Anostomidae). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 72:639-646, 2004.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Revista Ciência e Cultura**, 43:271-277, 1990.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e legislação pertinente. In: BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006, pp. 347-349.

BREDER, W.P.; ROSEN, D.E. **Modes of reproduction in fishes**. New York: Natural History Press. 1966, 941p.

BURATINI, S.V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006, pp. 78-79.

COWARD, K.; BROMAGE, N.R.; HIBITT, O.; PARRINGTON, J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 12:33-58, 2002.

DAUTREMEPUITS, C.; PARIS-PALACIOS, S.; BETOULLE, S.; VERNET, G. Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 137C:325-333, 2004.

EWALD, G. Chronic measures of toxicant - induced effects on fish. **Annales Zoologici Fennici**, 32:311-316, 1995.

FISHBASE. *Astyanax bimaculatus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4475&genusname=Astyanax&speciesname=bimaculatus>>. Acesso em: maio 2009.

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

FREIRE, M.M.; SANTOS, V.G; GINUINO, I.S.F.; ARIAS, A.R.L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, 12:347-354, 2008.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 59:376-381, 2007.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de histologia em cores**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 576p.

GARUTTI, V. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), em cursos de água da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, 49:489-495, 1989.

GASPAR DA LUZ, K.D. **Alimentação e sobreposição alimentar de três espécies de peixes, em lagoas da planície de inundação do alto rio Paraná**. 1996. 62p. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1996.

GENNARI FILHO, O.; BRAGA, F.M.S. Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *A.schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP). **Revista Unimar**, 18:241-254, 1996.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Science Publishers, Enfield, 2009. pp. 104-110

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 31:351-360, 2007.

GRIER, H.J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, 21:345-357, 1981.

GRIER, H.J.; LINTON, J.R.; LEATHERLAND, J.F.; DE VLAMING, V.L. Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. **American Journal of Anatomy**, 159:331-145, 1980.

GUNDERSEN, D.T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S.D.; MILLAR, J. G. BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordanes-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19:2275-2285, 2000.

GURGEL, H.C.B. Estrutura populacional e época de reprodução de *Astyanax fasciatus* (Cuvier) (Characidae, Tetragonopterinae) do Rio Ceará Mirim, Poço Branco, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 21:131-135, 2004.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. C.R.C. Press, Boca Raton, FL, 1987, 341p.

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.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, pp. 155-196.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological effects of environmental stressors on fishes. **American Fisheries Society Symposium**, 8:51-66, 1990.

HO, E. Zinc deficiency, DNA damage and cancer risk. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15:572-578, 2004.

HOLLIS, L.; PLAYLE, R.C. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, 50:703-720, 1997.

IHERING, R.V.; AZEVEDO, P.A. Curimatã dos açudes nordestinos (*Prochilodus argenteus*). **Arquivos do Instituto Biológico**. São Paulo, 5:143-184, 1934.

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

JOBLING, M. **Environmental biology of fishes**. London: Chapman e Hall, 1995, 455p.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P. da; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.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. In: REIS, R.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre- RS: Edipucrs, 2003, 729p.

LIONETTO, M.G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M.E.; PASCARIELLO, M.F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, 46:324-330, 2003.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução de: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; CUNNINGHAM, P.T.M. São Paulo: Editora USP. 1999, 535p.

MASON, C.F. **Biology of freshwater pollution**. 3ed. Londres: Longman, 1996, 387p.

MATTA, S.L.P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cells number per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, 143:970-978, 2002.

MATTA, S.L.P.; GOMES, M.L.M.; ANDRADE, D.R. Reproductive biology of *Oligosarcus argenteus* (Gunther, 1864) adult males and description of the gonadal maturation stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52:119-126, 2009.

MAYER, F.L.; VERSTEEG, D.J.; MCKEE, M.J.; FOLMAR, L.C.; GRANNEY, R.L.; McCUME, D.C.; RATTNER, B.A. Physiological and nonspecific biomarkers. In: HUGGETT, R.J.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, pp. 155-196.

MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises

histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Org.). **Limnologia fluvial - um estudo no rio Mogi-Guaçu**. São Carlos- SP, 2003, pp. 149-180.

MIURA, T. Spermatogenic cycle in fish. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999, pp. 571-578.

MORAIS, A.L.S.; MENDONÇA, M.C.F.B.; GAVILAN-LEANDRO, S.A.C.; SOUZA, I.M.M. Biologia Reprodutiva de *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Characidae, Characiformes), presente na Lagoa do Piató, em Assú, RN, Brasil. In: **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, 2007, p. 1-2.

MULLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Oxford; **Fishing News Books**, 1994, 378p.

NOMURA, H. Alimentação de três espécies de peixes do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae) do Rio Mogi-Guaçu, SP. **Revista Brasileira de Biologia**, 35:595-614, 1975.

OAKES, K.D.; VAN DER KRAAK, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in with sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, 63:447-463, 2003.

OLIVEIRA FILHO, E.C. **Toxicidade reprodutiva de poluentes ambientais para moluscos de água-doce: estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria***. 2003. 138p. Tese (Doutorado em Saúde Pública). Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2003.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**, 74:53-69, 2005.

OVERSTREET, R.M. Aquatic pollution problems, Southeastern U. S. Coasts: histopathological indicators. **Aquatic Toxicology**, 11:213-239, 1988.

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.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, 50:109-124, 2000.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, 6:459-497, 1995.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985, 666p.

ROMEO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, 48:185-194, 2000.

SANTOS, R.A.; CAMPOS, E.C.; CAMARA, C.; MANDELLI JUNIOR, J. Curvas de maturação gonadal e crescimento de fêmeas de tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Characiformes, Characidae), na represa de Ibitinga, Estado de São Paulo, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, 18:1-11, 1991.

SCHLENK, D.; BENSON, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London, 2001, 214p.

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.

SILVA FILHO, M.V.; OLIVEIRA, M.N.; CUNHA BASTOS, V.L.F.; ALVES, M.V.; CUNHA BASTOS, J. Validação de espécies sentinelas por biomarcação com colinesterase em peixes. In: ESPINDOLA, E.L.G.; PASCHOAL, C.M.B.; ROCHA, O.; BOHRER, M.B.C.; OLIVEIRA NETO, A.L. (Eds). **Ecotoxicologia: perspectiva para o séc. XXI**. São Carlos: RIMA, 2000, pp. 147-164.

SILVA, F.R.A. **Avaliação de processos de adsorção de metais pesados: um estudo experimental com propostas de utilização de subprodutos**. 2005, 95p. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Gestão). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2005.

SILVA, H.B.R. **Alimentação de *Astyanax bimaculatus* (Characiformes, Characidae) na área da influência do reservatório de Corumbá, GO**. 1998. 60p. Monografia (Especialização em Ciências Biológicas)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1998.

SILVA, J.V.; ANDRADE, D.R.; OKANO, W.Y. Desenvolvimento sexual e crescimento de lambaris - tambuí, *Astyanax bimaculatus* Linnaeus, 1758 submetidos a diferentes tipos de alimentação. **Arquivo de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 48:47-54, 1996.

SIRAJ BASHA, P.; USHA RANI, A. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilápia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56:218-221, 2003.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology normal and pathological features**. 2ed. Kodansha: Gustav Fischer Verlag, 1995, 195p.

TAVARES, T.M.; CARVALHO, F.M. Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambientes: exemplos do Recôncavo Baiano. **Química Nova**, 15:147-155, 1992.

TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, 37:51-70, 1997.

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

VAZ, M.M.; BARBOSA, N.D.C.; TORQUATO, V.C. **Guia Ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte. CEMIG/CETEC, 2000, pp. 54-55.

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: Eduem/SBI/CNPq/Nupelia, 1993, 169p.

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

WALLACE, R.A.; SELMAN, K. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **American Zoologist**, 21:325-343, 1981.

WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, 23:507-514, 2001.

WOOTTON, R.J. Introduction: strategies and tactics in fish reproduction. In: POTTS, **Fish reproductions: strategies and tactics**. London: Academic Press, 1984, pp. 1-12.

CAPITULO 1

BIOACUMULAÇÃO DE ZINCO EM *Astyanax aff. bimaculatus* APÓS EXPOSIÇÃO SUBCRÔNICA

RESUMO

Muitos metais ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e são classificados como poluentes quando adicionados pelos seres humanos em quantidades suficientes para produzir efeitos deletérios em algumas características do organismo. Dentre estes metais já existentes no ambiente aquático, pode-se citar o zinco (Zn) que é um elemento essencial para os seres vivos, mas em concentrações elevadas, pode se tornar tóxico aos seres vivos. Sendo assim, propôs-se com o presente estudo analisar a bioacumulação de Zn em diferentes tecidos de indivíduos machos adultos de lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*), a partir de exposição subcrônica em diferentes concentrações e avaliar a espécie como bioindicador. Foram utilizados 65 lambaris, divididos igualmente em 5 aquários. Foi constituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn na água, totalizando 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1} de Zn, respectivamente, no final do período experimental, de 30 dias. Ao final da exposição, os animais foram anestesiados, eutanasiados, medidos, pesados sendo retirados os ossos, testículos, fígado, brânquias, cabeça e músculo. Amostras dos tecidos coletados foram desidratadas e digeridas para a determinação das concentrações do Zn através do espectrofotômetro de absorção atômica. Nos tratamentos em que as dosagens de Zn na água foram de 5 e 10 mg L^{-1} , o acúmulo desse metal foi maior nos testículos, seguido das brânquias, ossos, cabeça e músculos. Nos tratamentos em que as dosagens de Zn na água foram de 15 e 20 mg L^{-1} , o acúmulo desse metal foi maior nas brânquias, seguido pelos testículos, ossos, músculo e cabeça. No fígado não houve acúmulo significativo em qualquer tratamento. As diferenças no nível da acumulação nos diferentes órgãos dos peixes podem primeiramente ser atribuídas às diferenças no papel fisiológico de cada órgão. O Zn mostrou-se altamente tóxico para *A. aff. bimaculatus*, em exposições subcrônicas, mesmo quando os animais foram expostos a concentração de 5 mg L^{-1} de Zn, estabelecida pela Resolução CONAMA nº 357 de 17/03/2005 como máximo permitida para água própria para a criação de animais. Sendo assim, *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando exposta a baixa concentração de Zn, podendo ser sugerida como bioindicador.

PALAVRAS-CHAVE: Cabeça, metal pesado, músculo, ossos, peixes, toxicologia.

ABSTRACT

Many metals occur naturally in aquatic environments and are classified as pollutants when added to humans in quantities sufficient to produce deleterious effects on some characteristics of the organism. Among these metals existing in the aquatic environment may be cited as zinc (Zn) which is an essential element for living beings. In high concentrations, the Zn can become toxic to living things, reducing serum levels of copper and causing a decrease in immunity. Therefore, it was proposed in this study to analyze the accumulation of Zn in different tissues of adult male individuals of tetra (*Astyanax aff. bimaculatus*), from subchronic exposure to different concentrations and assess the species as bioindicator. Sixty five lambaris were used, divided equally into five tanks. A control group was made, kept under the same conditions as the treated ones, nevertheless without the metal. Every day was added 0,16, 0,33, 0,5 and 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn in the water, adding up to 5, 10, 15 and 20 mg L^{-1} Zn, respectively, at the end of the experimental period, of 30 days. At the end of exposure, animals were anesthetized, euthanized, weighed, measured and the bones, testis, liver, gills, head and muscle were removed. Collected tissue samples were dried and digested for the determination of zinc concentrations over atomic absorption spectrophotometer. At the groups where the Zn serum in water were 5 and 10 mg L^{-1} , the accumulation of the metal was higher on the testis, followed by gills, bones, head and muscles, and in the treatments where the Zn serum in water were 15 and 20 mg L^{-1} , the accumulation of the metal was higher on the gills, followed by testis, bones, muscle and head. In the liver no significant accumulation in any treatment. The differences in the level of accumulation in different organs of fish can primarily be attributed to differences in the physiological role of each organ. The Zn was highly toxic to *A. aff. bimaculatus*, exhibitions subchronic, even when the animals were exposed to 5 mg L^{-1} Zn, established by CONAMA Resolution No. 357 of 17/03/2005 to maximum allowed for water suitable for breeding. Thus, *A. aff. bimaculatus* showed a sensitive species even when exposed to low concentrations of Zn, may be suggested as a bioindicator.

KEYWORDS: head, heavy metal, muscle, bones, fish toxicology.

INTRODUÇÃO

A partir da revolução industrial, um modelo de civilização se impôs, trazendo a industrialização como forma de produção e organização de trabalho e, como consequência, trouxe a disponibilidade de uma diversidade enorme de produtos químicos potencialmente tóxicos e a geração de resíduos em quantidade significativamente prejudicial ao ambiente (ZAGATTO, 2006).

Nas décadas de 1980/1990, os resultados de validação entre dados de testes de toxicidade laboratoriais *versus* levantamento das comunidades aquáticas *in loco* mostraram estreita correlação quando se utilizam espécies representativas do ambiente. É foi neste período que se intensificou a implementação dos testes ecotoxicológicos, para o estabelecimento de padrões de qualidade da água e de lançamento de efluentes líquidos, no monitoramento da qualidade das águas e na avaliação do nível de periculosidade e do risco de substâncias químicas no ambiente, visando o controle da poluição hídrica. Nesse período, foram intensificadas as pesquisas para o desenvolvimento de testes bioquímicos, biossensores e biomarcadores, para avaliação da exposição a concentrações subletais de agentes químicos (ZAGATTO, 2006).

Dependendo das propriedades físico-químicas do poluente, de sua concentração e também das características dos ecossistemas, podem ocorrer efeitos adversos à biota. Estes efeitos podem variar sistematicamente, incluindo desde respostas bioquímicas ou fisiológicas, denominadas respostas homeostáticas em organismos individuais, até a toxicidade em níveis de organização mais elevados, sobre um indivíduo, uma espécie, uma população, uma comunidade ou um ecossistema (BURATINI *et al.*, 2006).

Muitos metais ocorrem naturalmente em ambientes aquáticos e são classificados como poluentes quando adicionados pelos seres humanos em quantidades suficientes para produzir efeitos deletérios em algumas características do organismo (WOLFE, 1974; FREEDMAN, 1989). Os metais pesados acumulam-se nos tecidos de animais aquáticos, podendo tornar-se tóxicos, dependendo dos níveis de acumulação, que variam consideravelmente entre metais e espécie (HEATH, 1987). A presença de alguns metais pesados em ambientes aquáticos e suas acumulações nos peixes e nos outros organismos foi estudada por vários autores: a presença de cádmio (Cd), cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e chumbo (Pb) em *Mullus barbatus* e *Sparus aurata* (KARGIN, 1996), Cd, Pb, Cu, cromo (Cr), níquel (Ni), Zn e Fe em *Mugil cephalus*, *Mullus barbatus* e *Caranx crysos* (KALAY *et al.*, 1999), Cd, Cr, Fe, Pb e Zn em *Sparus auratus*, *Atherina hepsetus*, *Mugil*

cephalus, *Trigla cuculus*, *Sardina pilchardus* e *Scomberesox saurus* (CANLI; ATLI, 2003), Fe, Co, Ni, Cr, Pb e Zn em *Mugil cephalus* e *Trachurus mediterraneus* (YILMAZ, 2003), Cd, Fe, Pb, Zn, Cu manganês (Mn), Ni, Cr, cobalto (Co) e alumínio (Al) em *Saurida undosquamis*, *Sparus aurata* e *Mullus barbatus* (TURKMEN *et al.*, 2005).

Dentre estes metais já existentes no ambiente aquático, pode-se citar o Zn que é um elemento essencial para os seres vivos. Seu papel engloba a participação na regulação e inicialização da resposta imune, esteroidogênese, espermatogênese, metabolismo da vitamina A, metabolismo energético, síntese protéica e divisão celular, além de apresentar importante função antioxidante (SALGUEIRO *et al.*, 2000; FASCINELI, 2001). É um elemento que se apresenta em quantidades diminutas no organismo, representando apenas 0,003% (1,4 a 2,3 g) do corpo humano (TASMAN-JONES, 1992). Ele se apresenta em maiores concentrações no cérebro, na próstata, no esperma, na pele e nos seus anexos, no fígado, no pâncreas, nos ossos e no sangue de mamíferos (TASMAN-JONES, 1992; WEISS *et al.*, 2001). Nos peixes encontra-se em média de 3 a 5 mg kg⁻¹ de Zn (OEHLENSCHLAGER, 2002).

Os peixes servem como alimento para diversos animais e cada vez mais os seres humanos são dependentes dos peixes como fonte protéica, sendo, portanto, essencial saber o impacto da poluição da água sobre estes organismos. A assimilação e a retenção de um contaminante por um organismo podem acarretar a concentração elevada do mesmo, resultante da absorção direta, a partir do ambiente, ou da sua transferência nos níveis tróficos (BURATINI *et al.*, 2006).

Por se tratar de um metal essencial para a nutrição, o Zn tem papéis estruturais e regulatórios em muitos sistemas biológicos. Porém, em concentrações elevadas, o Zn pode se tornar tóxico aos animais e humanos (BENTLEY, 1992; ROMANI *et al.*, 2003; CELIK; OEHLENSCHLAGER, 2004), diminuindo os níveis séricos de Cu e causando a diminuição da imunidade (SHAMBAUGH, 1989). Os efeitos tóxicos do Zn devem-se, principalmente, às interações com outros elementos conforme demonstrado por HOGSTRAND e WOOD (1995), relataram que concentrações subletais de Zn, em peixes, causaram a inibição da absorção de Ca²⁺, já que estes íons competem pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias. Consequentemente, essa redução da concentração de Ca afetaria a integridade da membrana celular e a estabilização da permeabilidade branquial (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

Diversos estudos têm utilizado peixes como bioindicadores demonstrando que os metais pesados podem alterar as atividades fisiológicas e os parâmetros bioquímicos nos

tecidos e no sangue (BASHA; RANI, 2003; CANLI, 1995). Alguns autores revisaram os efeitos tóxicos e a bioacumulação de Cr, Cu, Pb, e Zn em *Poxomis nigromaculatus*, *Lepomis macrochirus* e *Micropterus salmoides* (AUCOIN *et al.*, 1999) e de Zn e Cd em *Mytilus galloprovincialis* (ADAMI *et al.*, 2002).

Diversos estudos relatam a inibição da atividade colinesterásica plasmática e cerebral, as mudanças comportamentais na motilidade e na perda do equilíbrio em *Brycon cephalus* (AGUIAR *et al.*, 2004), *Piaractus mesopotamicus* (BASTOS *et al.*, 1998), *Salmo trutta* e *Pleuronectes americanus* (PAYNE *et al.*, 1996), *Danio rerio* (ROEX *et al.*, 2003), *Callichthys callichthys* (SILVA *et al.*, 1993), *Limanda limanda*, *Platichthys flesus* e *Serranus cabrilla* (STURM *et al.*, 1999), *Oreochromis niloticus* (THANGNIPON *et al.*, 1995). Alterações na composição bioquímica das brânquias e dos músculos, como a resposta ao estresse causado pela poluição ambiental, também foram avaliadas (JAMES *et al.*, 1995; VIRK; SHARMA, 2003).

Neste contexto, a proposta deste estudo foi determinar os efeitos biológicos de diferentes concentrações de Zn, verificando sua bioacumulação em diferentes tecidos de indivíduos machos adultos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*), após exposição subcrônica, visando avaliar esta espécie como potencial bioindicadora.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), protocolo nº 95806/2009. Foram utilizados 65 machos de *A. aff. bimaculatus*, procedentes da Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, localizada na cidade de Viçosa-MG.

A pesquisa foi desenvolvida nos seguintes Laboratórios: Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária; Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral; Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal; Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, todos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados cinco aquários de vidro, cada um com capacidade de 150 L de água livre de cloro (por evaporação), mantendo-se 13 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 l/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos aquários era sifonado para eliminar restos de matéria orgânica e, imediatamente,

substituído, mantendo-se as mesmas características iniciais. A qualidade da água foi monitorada a cada sete dias, medindo-se: o oxigênio dissolvido, a amônia tóxica, a dureza total e o nitrito através de *kits* colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH, pelo medidor de pH digital de bancada (Tracom 10) e a condutividade elétrica, pelo condutivímetro digital de bancada (Tonka CD 820). Foram coletadas amostras de água a cada sete dias para determinação das concentrações de Zn através do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

A temperatura foi controlada (26 ± 1 °C) (FISHBASE, 2009) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W). O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro, controlado por temporizador. Os peixes tiveram alimentação diária *ad libitum* ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida 2 vezes ao dia, às 8 e às 17 horas. Essa ração apresenta-se em grânulos de 4 mm e, devido à incompatibilidade com o tamanho da cavidade bucal dos peixes, foi triturada e peneirada, utilizando-se peneira com malha de 1 mm.

Os animais foram expostos a concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn na água, que foram divididas durante o período experimental, de 30 dias. A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 µg L⁻¹ de Zn, fornecido na forma de ZnSO₄.7H₂O (Merck, nº 1.08883.1000). Foi constituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. Cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 13 repetições.

A partir do momento que foi observado mortalidade dos animais, no 15º dia experimental, foram feitas observações a cada hora para retirada dos animais mortos nesse intervalo. Estes animais foram submetidos aos mesmos procedimentos daqueles que sobreviveram até o final do tempo de exposição. Ao final do período experimental, os animais foram previamente anestesiados com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia, sendo então eutanasiados por secção da medula espinhal, ao nível do opérculo.

De cada exemplar foram registrados os seguintes dados: comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG), peso do fígado (PF), peso das brânquias (PB), peso dos fragmentos de músculos (PM), peso da cabeça (PCa) e peso dos fragmentos dos ossos (PO). Os pesos foram obtidos utilizando-se uma balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Scientech, AS 210). Para a medição, utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de 0,02 mm e, para a retirada dos tecidos, tesoura e bisturi cirúrgico. Para a histologia das brânquias, foram

utilizados fragmentos da região mediana do segundo arco braquial, e para a histologia do fígado e dos testículos, as regiões medianas dos respectivos órgãos.

As amostras de fragmentos de ossos, testículos, fígado, brânquias, cabeça e músculo, após pesagem em balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Scientech AS 210), foram mantidas em estufa, a 70 °C, até alcançarem peso seco constante. As amostras pré-secas foram acondicionadas em *erlenmeyer* de 25 mL, seguidas da adição de 1,5 mL de HNO₃ concentrado, 0,5 mL de HClO₄ 70%, 2 gotas de água oxigenada 30% e 1 gota de querosene para reduzir a formação de espuma. A temperatura do bloco digestor foi aumentada gradualmente, iniciando a 70 °C até atingir 90 °C, de forma que a digestão completa durasse cerca de 30 minutos. Após diluição do material digerido, procedeu-se à determinação das concentrações dos elementos minerais através do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian), com os resultados expressados em mg g⁻¹ de massa de tecido fresco.

Os resultados de acúmulo do Zn nos tecidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de Newman-Keuls com valor de $p \geq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A qualidade da água avaliada durante o período experimental não diferiu significativamente ao longo do período nem entre os diferentes tratamentos, exceto com relação à condutividade elétrica, que aumentou à medida que a concentração de Zn na água aumentava (TAB. 1 - ANEXO A). Os resultados de pH, oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito encontravam-se dentro da faixa determinada como adequada para peixes de água doce (OSTRENSKY; BOEGER, 1998; MOREIRA *et al.*, 2001; ARANA, 2004). A condutividade elétrica acima de 100 $\mu\text{S cm}^{-1}$ está associada, em geral, a ambientes impactados fornecendo assim uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece qualquer indicação das quantidades relativas dos vários componentes. À medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados, a condutividade da água aumenta e altos valores podem indicar características corrosivas da água (CETESB, 2009).

A concentração de Zn dos aquários foi monitorado a cada sete dias. Constatou-se que as concentrações deste elemento sofreram aumento gradativo durante os 30 dias de exposição. No entanto, a adição diária de Zn, embora tenha ocasionado aumento na concentração do mesmo em solução, não atingiu os valores definidos nos tratamentos. Provavelmente, processos adsorptivos nas paredes dos recipientes ou com material em

suspensão tenham colaborado para que as concentrações definidas nos tratamentos não tenham sido alcançadas.

O comprimento padrão e os pesos do fígado, dos testículos e da cabeça variaram significativamente entre os tratamentos e o controle (TAB. 1). No entanto, não foram observadas diferenças significativas no peso e altura corporal e peso das brânquias.

Foi observada redução do peso do fígado e aumento dos testículos, diferente do que foi observado por ANDERSSON *et al.* (1988), em percas (*Perca fluviatilis*), os quais relataram redução no crescimento da gônada e aumento no tamanho do fígado como sintomas de peixes expostos a águas poluídas por metais pesados.

Tabela 1: Biometria corporal de machos de *A. aff. bimaculatus* (um grupo controle e quatro tratamentos) em condições de exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias

Padrões	Concentração de Zinco (mg L ⁻¹)				
	0	5	10	15	20
PC (g)	5,437 ^a	6,811 ^a	10,311 ^a	7,085 ^a	6,536 ^a
CP (cm)	4,710 ^a	6,336 ^b	6,764 ^b	6,747 ^c	6,822 ^b
AC (cm)	2,280 ^a	2,063 ^a	2,194 ^a	2,152 ^a	2,311 ^a
PF (g)	0,044 ^a	0,039 ^{ab}	0,021 ^b	0,023 ^b	0,028 ^{ab}
PT (g)	0,053 ^a	0,157 ^b	0,180 ^b	0,197 ^b	0,204 ^b
PB (g)	0,184 ^a	0,183 ^a	0,209 ^a	0,223 ^a	0,208 ^a
PCa (g)	0,839 ^a	1,109 ^b	1,005 ^{ab}	1,055 ^b	0,993 ^b

Legenda: PC: peso corporal; CP: comprimento Padrão; AC: Altura Corporal; PF: Peso do Fígado; PT: Peso dos Testículos; PB: Peso das Brânquias e PCa: Peso da Cabeça.
Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, $p \geq 0,05$.

No grupo controle e no grupo tratado com concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn não houve mortalidade dos peixes até o final do experimento. Entre o 15° e o 28° dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

A morte dos peixes foi precedida de comportamento anormal, permanecendo próximos à superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia. Aqueles que sobreviveram reduziram a ingestão de alimento. Por outro lado, os animais que não receberam o Zn e aqueles que receberam o metal na concentração de 5 mg

L⁻¹, movimentavam-se intensamente em cardumes e se alimentavam normalmente, mostrando comportamento semelhante ao grupo de controle.

Tabela. 2: Percentual da mortalidade de *A. aff. bimaculatus* durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L⁻¹) (n = 13).

Concentração de zinco (mg L ⁻¹)	Mortalidade (%)					Total
	Tempo (dias)					
	14	20	25	28	30	
0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
10	0	24	18	20	0	62
15	0	23	27	35	0	85
20	0	26	32	42	0	100

Trabalho realizado por SANTOS (2009) utilizando-se *Astyanax aff. bimaculatus* sob exposição aguda (96 h), verificou-se que não houve mortalidade em concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn, enquanto que na concentração de 20 mg L⁻¹ ocorreu 100% de mortalidade em apenas 24 horas. A concentração letal para 50% dos organismos (CL50) na exposição aguda (96 horas), para *A. aff. bimaculatus*, foi determinada como sendo de 10 mg L⁻¹ de Zn, o dobro do permitido pela legislação brasileira (5 mg L⁻¹) na água para criação de animais (CONAMA, 2005), indicando o alto nível de toxicidade do Zn para a espécie em estudo.

Nos tratamentos em que as dosagens de Zn na água foram de 5 e 10 mg L⁻¹, o acúmulo desse metal foi maior nos testículos, seguido das brânquias, ossos, cabeça e músculos (TAB. 3 - FIG. 1). No fígado não houve acúmulo significativo entre os tratamentos. Contrariamente, alguns trabalhos relatam expressivo acúmulo de Zn no fígado, como em *Channa punctatus* (MURUGAN *et al.*; 2008) e em outras três espécies de peixes (ISMAIL; ABU-HILAL; 2008). Nos demais órgãos, como brânquias, gônadas e músculo, os relatos são coerentes com os resultados obtidos neste trabalho (ISMAIL; ABU-HILAL; 2008; MURUGAN *et al.*; 2008). Estudos realizados em *Astyanax aff. bimaculatus* demonstraram que o acúmulo de Zn, após a exposição aguda com 10 mg L⁻¹, ocorreu de forma mais expressiva em brânquias e ossos e, na exposição com 5 mg L⁻¹ não houve diferença de acúmulo entre os indivíduos tratados e o controle (SANTOS, 2009).

Tabela. 3: Concentração de zinco em tecidos (mg g⁻¹) de machos de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

Concentração de Zinco (mg L ⁻¹)					
Tecidos	0	5	10	15	20
Testículos	0,0001 ^a	0,1715 ^a	0,3106 ^a	0,0596 ^a	0,0750 ^a
Brânquias	0,0001 ^a	0,1152 ^b	0,2804 ^c	0,2873 ^b	0,3411 ^b
Osso	0,0001 ^a	0,0264 ^b	0,0269 ^b	0,0317 ^b	0,0344 ^b
Cabeça	0,0001 ^a	0,0142 ^b	0,0115 ^{ab}	0,0099 ^b	0,0101 ^b
Músculo	0,0001 ^a	0,0108 ^b	0,0104 ^b	0,0128 ^b	0,0235 ^c

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, p ≥ 0,05

Daqueles tecidos que acumularam Zn, verificou-se que as menores concentrações foram detectadas nos músculos, conforme constatado por MARCOVECCHIO e MORENO (1993). Trabalho feito com *A. aff. bimaculatus*, sob exposição aguda de Zn, não foi verificado acúmulo deste elemento na musculatura (SANTOS; 2009). Este reduzido acúmulo de Zn no músculo de peixes pode ser devido à transferência do metal acumulado para outros órgãos (CINIER *et al.*, 1998; MADHUSUDAN *et al.*, 2003).

Nos tratamentos em que as dosagens de Zn na água foram de 15 e 20 mg L⁻¹, o acúmulo desse metal foi maior nas brânquias, seguidas pelos testículos, ossos, músculo e cabeça (TAB. 3 e FIG. 1). No fígado não houve acúmulo significativo entre os tratamentos. Estudos realizados com *A. aff. bimaculatus*, sob exposição aguda de Zn, constataram que à medida que se aumenta a concentração do metal na água, aumenta também o seu acúmulo nas brânquias, caracterizando dose dependência (SANTOS, 2009).

O elevado acúmulo do Zn nas brânquias, encontrado neste estudo, pode ser justificado pelo fato do epitélio branquial ser a principal superfície de contato com o ambiente e por constituir um importante alvo dos poluentes presentes na água, devido à sua extensa área superficial (WONG; WONG, 2000). O excesso de Zn nas brânquias é considerado tóxico por provocar efeitos deletérios, tais como hipocalcemia (SPRY; WOOD, 1985) e neurodegeneração (FREDERICKSON; BUSH, 2001). Um dos mais importantes efeitos subletais do Zn em peixes é a inibição da absorção de Ca²⁺ já que estes íons competem pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias (HOGSTRAND; WOOD, 1995). A redução da concentração de Ca²⁺ é prejudicial ao organismo, já que este elemento

é essencial para a integridade da membrana celular e estabilização da permeabilidade branquial (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

Estudos realizados com *A. aff. bimaculatus*, sob exposição aguda de Zn revelou que, nos tratamentos com concentração superior a 10 mg L⁻¹, o acúmulo desse metal foi maior no fragmento ósseo, seguido de testículo e músculo (SANTOS, 2009). Dependendo da forma de exposição, se aguda ou crônica, e dos órgãos analisados, verifica-se que o Zn pode acumular-se nos diversos tecidos em diferentes magnitudes. A exposição aguda de 10 mg L⁻¹ de Zn resultou em maiores concentrações do elemento no fragmento ósseo, seguido de testículo e músculo de *Astyanax aff. bimaculatus* (SANTOS, 2009). Em *Oncorhynchus mykiss* sob exposição crônica, as maiores concentrações ocorreram nas brânquias, fígado e rins (McGEER *et al.* 2000).

A determinação da concentração de Zn na cabeça dos peixes, embora tenha resultado em reduzidos valores, é parâmetro importante para se avaliar o grau de toxicidade de determinado metal, conforme foi verificado por NAJI *et al.* (2007) no estudo de avaliação da poluição e comprometimento de peixes no rio Galma envolvendo cinco metais pesados.

Nos ossos de *A. aff. bimaculatus*, houve diferenças entre todos os tratamentos quanto ao acúmulo de Zn, mostrando ser dose-dependente. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com exposição aguda, nas concentrações de 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn, em *A. aff. bimaculatus* (SANTOS, 2009).

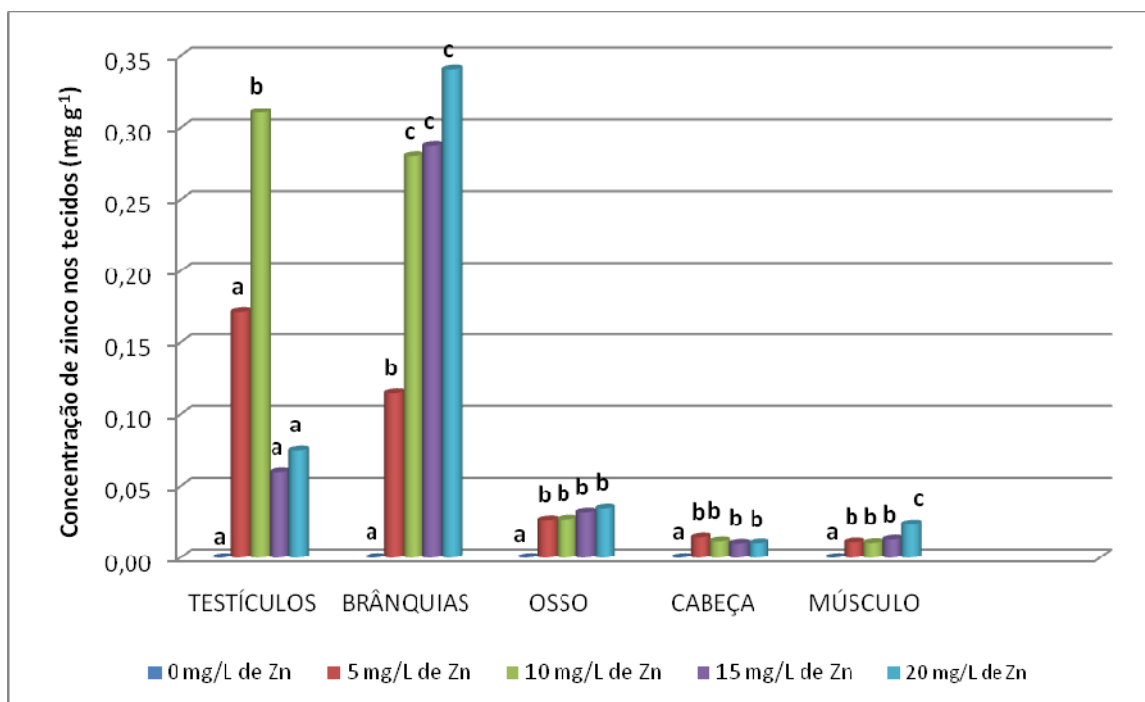


Figura. 1. Concentração de zinco nos tecidos (mg/g) de machos de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

*Letras iguais sobre barras do mesmo tecido não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, $p \geq 0,05$.

A baixa concentração de Zn acumulado no tecido hepático, observado neste estudo, pode ser justificada, em parte, pelo aumento da excreção biliar e/ou excreção renal induzido pela atuação de hormônios, como as catecolaminas, que têm a produção aumentada sob condições de estresse (WEPENER *et al.*, 2001).

As diferenças no nível da acumulação nos diferentes órgãos dos peixes podem, primeiramente, ser atribuídas às diferenças no papel fisiológico de cada órgão (KARUPPASAMY, 2004) e, conseqüentemente, da capacidade de tolerância e das diversas funções regulatórias que podem influenciar nas diferenças da acumulação nos tecidos (ROMANENKO *et al.*, 1986).

CONCLUSÕES

O Zn mostrou-se altamente tóxico para *A. aff. bimaculatus*, em exposições crônicas, mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira.

Nos tratamentos contendo 5 e 10 mg L⁻¹ de Zn na água, houve maior acúmulo deste metal nos testículos, seguidos pelas brânquias, osso, cabeça e músculo. Nos tratamentos contendo 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn na água houve maior acúmulo de zinco nos tecidos

branquiais seguido dos testículos, osso, músculo e cabeça. O fígado não apresentou acúmulo significativo em nenhum dos tratamentos.

Os resultados apresentados comprovam a acumulação crescente do Zn nos diferentes tecidos dos animais em estudo submetidos a exposição subcrônica (30 dias). Assim, o *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível, mesmo quando exposta a baixas concentrações de Zn na água, sendo, portanto, adequada para utilização como bioindicador potencia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMI, G. M.; BARBIERI, P.; FABIANI, M.; PISELLI, S.; PREDONZANI, S.; REISENHOFER, E. Levels of cadmium and zinc in hepatopancreas of reared *Mytilus galloprovincialis* from the Gulf of Trieste (Italy). **Chemosphere**, 48:671-677, 2002.

AGUIAR, L.H.; MORAES, G; AVILEZ, I.M.; ALTRAN, A.E.; CORRÊA, C.F. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. **Environmental Research**, 95:224-230, 2004.

ANDERSSON, T.; FÖRLIN, L.; HÄRDIG, J.; LARSSON, A. Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 45:1525-1536, 1988.

ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis: UFSC, 2004, 231p.

AUCOIN, J.; BLANCHAND, R.; BILLIOT, C. Trace metals in fish and sediments from lake Boeuf, South Eastern Louisiana. **Microchemical Journal**, 62:299-307, 1999.

BASHA, P.S.; RANI, A.U. Cadmium induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 56:218-221, 2003.

BENTLEY, P.J. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 101C:215-217, 1992.

BURATINI, S.V.; BRANDELLI, A. BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. Bioacumulação. In: BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia Aquática – princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006, pp. 54-57.

CANLI, M.; ATLI, G. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. **Environmental Pollution**, 121:129-136, 2003.

CELIK, U.; OEHLENSCHLAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, 87:343-34, 2004.

CETESB. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: acessado em 6 de julho de 2009

CINIER C.D.C.; RAMEI M.P, FAURE, R; BORTOLATO, M. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 61:793-799, 1998.

CONAMA - **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução CONAMA nº357 de 17/03/05, 2005.

DE LA TORRE, F.R.; SALIBIÁN, A.; FERRARI, L. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. **Environmental Pollution**, 109:277-282, 2000.

FASCINELI, M.L. **Estudo da ação do zinco na teratogenicidade produzida pelo arsênio em camundongos**. 2001.77p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Farmacologia)). Universidade Estadual Paulista/Unesp. Botucatu, 2001.

FISHBASE. *Astyanax bimaculatus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4475&genusname=Astyanax&speciesname=bimaculatus>>. Acesso em: jan. 2009.

FREDERICKSON, C.J.; BUSH, A.I. Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. **Biometals**, 14:353-366, 2001.

FREEDMAN, B. **Environmental ecology: the impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function**. Academic Press.1989, 424p.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1987, 245p.

HOGSTRAND, C.; WOOD, C.M. Mechanisms for zinc acclimation in freshwater rainbow trout. **Marine Environmental Research**, 39:131-135, 1995.

ISMAIL N.S.A.; ABU-HILAL, A.H. Heavy metals in three commonly available coral reef species from the Jordan Gulf of Aqaba, Red Sea Jordan. **Journal of Biological Sciences**, 1:13-18, 2008.

JAMES, R.V.; SAMPATH, K.; SIVA KUMAR, V.; BABU, S.; SHANMUGANANDAM, P. Toxic effects of copper and mercury on food intake, growth and proximate chemical composition in *Heteropneustes fossilis*, **Journal of Environmental Biology**, 16:1-6, 1995.

- KALAY, M.; AY, O; CANLI, M. Heavy metal concentration in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea. **Environmental Contamination and Toxicology**, 63:673–681, 1999.
- KARGIN, F. Seasonal changes in levels of heavy metals in tissues of *Mullus barbatus* and *Sparus aurata* collected from Iskenderun Gulf (Turkey). **Water, Air and Soil Pollution**, 90:557-562, 1996.
- KARUPPASAMY, R. Evaluation of Hg concentration in the tissue of fish *Channa punctatus* (Bloch.) in relation to short and long-term exposure to phenyl mercuric acetate. **Journal Plate Jubilee A.U.**, 40:197, 2004.
- MADHUSUDAN, S.; FATMA, L.; NADIM, C. Bioaccumulation of zinc and cadmium in freshwater fishes. **Indian Journal Fish**, 50:53-65, 2003.
- McGEER, J.C.; SZEBEDINSZKY, C.; MCDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, 50:231-243, 2000.
- MOREIRA, A.B.; VISENTAINER, J.V; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, 14:565-570, 2001.
- MURUGAN, S.S.; KARUPPASAMY, R.; POONGODI, K.; PUVANESWARI, S. Bioaccumulation pattern of zinc in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch.) after chronic exposure. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 8:55-59, 2008.
- NAJI, J.C.; UZAIRU, A.; HARRISON, G.F.S.; BALARABE, M.L. Evaluation of cadmium, chromium, copper, lead and zinc concentrations in the fish head/viscera of *Oreochromis niloticus* and *Synodontis schall* of River Galma, Zaria, Nigeria. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, 6:2420-2426, 2007.
- OEHLENSCHLAGER, J. Identifying heavy metals in fish. In: BREMMER, H.A. (Ed.). **Safety and quality issues in fish processing**. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2002, pp. 95-113.
- OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211p.
- PAYNE, J.F.; MATHIEU, A.; MELVIN, W.; FANCEY, L.L. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. **Marine Pollution Bulletin**, 32:225-231, 1996.
- ROEX, E.W.M.; KEIJZERS, R; GESTEL, C.A.M. van. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**, 64:451-460, 2003.

ROMANENKO, V.D.; MALYZHEVA, T.D.; YU, Y.N. The role of various organs in regulating zinc metabolism in fish. **Hydrobiology**, 21:7-12, 1986.

ROMANI, R.; ANTOGNETTI, C.; BALDRACCHINI, F.; DE SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, 145:321-329, 2003.

SALGUEIRO, M.J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; SARABIA, M.I.; CARO, R.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; WEIL, R.; BOCCIO, J. Zinc as an essential micronutrient: a review. **Nutrition Research**. 20:737-755, 2000.

SANTOS, D.C.M. **Toxidez aguda do zinco em lambari *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. 115p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SHAMBAUGH, G.E.Jr. Zinc: the neglected nutrient. **American Journal of Otolaryngology**, 10:156-160, 1989.

SILVA, H.C.; MEDINA, H.S. G.; FANTA, E.; BACILA, M. Sub-lethal effects of the organophosphate Folidol 600 (Methyl parathion) on *Callichthys callichthys* (Pisces: Teleostei). **Comparative Pharmacology and Toxicology**. 105:197-201, 1993.

SPRY, D.J.; WOOD, C.M. Ion flux rates, acid-base status, and blood gases in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed to toxic zinc in natural soft-water. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42:1332-1341, 1985.

STURM, A.; ASSIS, H.C.S.; HANSEN, P.D. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**. Oxon, 47:1-9, 1999.

TASMAN-JONES, C. Distúrbios no metabolismo de oligoelementos. In: WYNGAARDEN, J.B.; SMITH, L.H.; BENNETT, J.C. **Tratado de Medicina Interna**. 19ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, vol.1, pp. 1204-1207.

THANGNIPON, W.; THANGNIPON, W.; LUANGPAÍBOON, P.; CHINABUT, S. Effects of the organophosphate insecticide, monocrotophos, on acetylcholinesterase activity in the Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) brain. **Neurochemical Research**, 20:587-591, 1995.

TURKMEN, A.; TURKMEN, M.; TEPE, Y.; AKYURT, I. Heavy metals in three commercially valuable fish species from Iskenderun Bay, Northern East Mediterranean Sea, Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, 91:167-172, 2005.

VIRK, S.; SHARMA, A. Changes in the biochemical constituents of gills of *Cirrhinus mrigala* following exposure to metals. **Indian Journal of Fisheries**, 50:113-117, 2003.

WAQAR, A. Levels of selected heavy metals in Tuna fish. **Arabian Journal for Science and Engineering**, 31:89-92, 2006.

WEISS, J.; SENSI, S.L.; KOH, J.Y. Zn^{2+} : A novel ionic mediator of neural injury in brain disease. **Trends in Pharmacological Sciences**, 21:395-401, 2001.

WEPENERL, V.; VAN VUREN, J.H.J.; DU PREEZ, H.H. Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparrmanii*. **Water SA Research**, 27:99-108, 2001.

WOLFE, D.A. **Pollution and Physiology of Marine Organisms**. New York: Academic Press, 1974, 492 p.

WONG, C.K.; WONG, M.H. Morphological and biochemical changes in the gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, 48:517-527, 2000.

YILMAZ, A.B. Levels of heavy metals (Fe, Cu, Ni, Cr, Pb and Zn) in tissue of *Mugil cephalus* and *Trachurus mediterraneus* from Iskenderun Bay, Turkey. **Environmental Research**, 92:277–281, 2003.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A. **Ecotoxicologia Aquática- princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006, pp. 3-5.

CAPÍTULO 2

MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS E DO FÍGADO DE *Astyanax aff. bimaculatus* EXPOSTOS AO ZINCO

RESUMO

Respostas biológicas ao estresse provocado por metais pesados, como o zinco (Zn), por exemplo, podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e podem ser denominadas biomarcadores. Assim, o trabalho ora desenvolvido propôs-se a estudar os efeitos de diferentes concentrações de Zn na histologia das brânquias e do fígado de lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*) machos adultos, após exposição subcrônica, e avaliar a espécie como bioindicador de ambientes impactados. Foram utilizados 65 lambaris, divididos igualmente em 5 aquários. Foi constituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn na água, totalizando 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1} de Zn, respectivamente, no final do período experimental, de 30 dias. Ao final da exposição, os animais foram anestesiados, eutanasiados, medidos, pesados sendo retirados os ossos, testículos, fígado, brânquias, cabeça e músculo. Fragmentos de brânquias e fígado foram fixados, incluídos e seccionados em micrótomo rotativo e corados para confecção de preparações histológicas. Foram qualificadas e quantificadas várias histopatologias nas brânquias e no fígado onde também foram quantificados pontos sobre núcleo e citoplasma de hepatócitos, capilar sinusóide e infiltrados leucocitários, além da determinação do diâmetro nuclear dos hepatócitos e calculados os índices hepatossomáticos. A presença de alterações histológicas das brânquias e do fígado, para cada organismo, foi avaliada de forma semi-quantitativa através do método *Degree of Tissue Change* (DTC), o qual foi baseado na gravidade das lesões. Todos os grupos tratados obtiveram valores de DTC superiores a 100, com média 582 ± 28 e 440 ± 10 , indicando a presença de alterações irreversíveis nas brânquias e no fígado, respectivamente. Em relação aos índices hepatossomáticos, houve redução significativa em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle. Constatou-se que as alterações histológicas revelam que as crescentes contaminações causadas pelos altos níveis de Zn afetam o ambiente aquático, comprometendo a função dos tecidos e causando a morte dos peixes, e que esta espécie foi adequada como bioindicador do ecossistema aquático.

PALAVRAS-CHAVE: Histopatologias, peixes, toxidez.

ABSTRACT

Biological responses to stress caused by heavy metals such as zinc (Zn), for example, can be used to identify early signs of damage to fish and can be called biomarkers. Thus, the work developed now proposed to study the effects of different concentrations of Zn in the histology of the gills and liver of tetra (*Astyanax aff. bimaculatus*) adult males after subchronic exposure, and assess the species as a bioindicator of similar environments. 65 minnows were used, divided equally into 5 tanks. Was a control group, kept under the same conditions as the treated, but without the metal. Sixty five lambaris were used, divided equally into five tanks. A control group was made, kept under the same conditions as the treated ones, nevertheless without the metal. Every day was added 0,16, 0,33, 0,5 and 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn in the water, adding up to 5, 10, 15 and 20 mg L^{-1} Zn, respectively, at the end of the experimental period, of 30 days. At the end of exposure, animals were anesthetized, euthanized, weighed, measured and the bones, testis, liver, gills, head and muscle were removed. Collected tissue samples of gills and liver were fixed, included and sectioned with a rotary microtome and stained for making histological preparations. Were classified and quantified various histopathology in the gills and liver which were also measured points on the nucleus and cytoplasm of hepatocytes and sinusoidal capillary leukocyte infiltration, and determination of the nuclear diameter of hepatocytes and hepatossomatic calculated indexes. The presence of histological changes of the gills and liver, for each organism was evaluated in a semi-quantitative method through the Degree of Tissue Change (DTC), which was based on the severity of injuries. All treated groups achieved values of DTC than 100, averaging 582 ± 28 and 440 ± 10 , indicating the presence of irreversible changes in the gills and liver, respectively. Compared to the hepatossomatic, decreased significantly in all treated groups compared to the control group. Histological changes show that the increasing contamination caused by high levels of Zn affect the aquatic environment, compromising the function of tissues and causing the death of fish. It was found that Zn had severe effects in different concentrations for the subchronic toxicity tests, and that this species appropriate as bioindicators of the aquatic ecosystem.

KEY WORDS: Histopathology, fish toxicity.

INTRODUÇÃO

O crescimento populacional verificado nas últimas décadas, acoplado ao avanço tecnológico e ao aumento da geração de produtos industriais, dentre os quais a manufatura de produtos químicos para serem usados como fertilizantes, inseticidas e herbicidas, tem levado a economia global a uma expansão do nível de compostos xenobióticos no ecossistema aquático. Tal fato vem contribuindo para a redução da qualidade dos diversos compartimentos ambientais (água, sedimento, ar e solo), bem como para o comprometimento da saúde dos seres vivos que habitam esses ecossistemas (CAJARAVILLE *et al.*, 2000).

Através das primeiras discussões científicas mundiais sobre prevenção de impactos ambientais, em 1992, a Agência Americana de Proteção Ambiental (United States Environmental Protection Agency – USEPA) lançou uma nova abordagem, intitulada “Avaliação de Risco”. Esta abordagem incorpora informações derivadas cientificamente, com preocupações sociais e econômicas, para projetar as consequências da ação de estressores de origem antrópica sobre o ambiente e, com base nesse modelo projetado, definirem ações para evitá-las (JESUS; CARVALHO, 2008).

Processos naturais e atividades antrópicas liberam para o ambiente aquático uma grande variedade de produtos tóxicos, dentre eles metais como o Zn (BENTLEY, 1992; RASHED, 2001; BORDAJANDI *et al.*, 2003), capazes de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações, as quais podem gerar graves consequências em populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (JESUS; CARVALHO, 2008).

O Zn é um metal de transição considerado micronutriente essencial, necessário para a função celular (KARAN *et al.*, 1998; McGEER *et al.*, 2000). É considerado o mais abundante elemento traço intracelular e está envolvido na estrutura e na função de mais de 300 enzimas, sendo essencial para a função celular e metabólica. Este íon também é integrante de metaloenzimas como a fosfatase alcalina, álcool desidrogenase e anidrase carbônica (WATANABE *et al.*, 1997; CELIK; OEHLenschAGER, 2004).

A absorção de Zn pode ocorrer diretamente através da água ou indiretamente através da cadeia alimentar (BENTLEY, 1992; HAMILTON *et al.*, 1998). Nos peixes, as brânquias, são órgãos multifuncionais que executam funções vitais como a respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico e excreção (NEWSTEAD, 1987; FRACÁCIO *et al.*, 2003; PANDEY *et al.* 2008). Por estarem em contato direto com o meio externo e por apresentarem uma vasta área superficial, as brânquias interagem e absorvem tóxicos

facilmente, representando alvos preliminares de distúrbios provocados pelos poluentes aquáticos (MALLAT, 1985; EVANS, 1987). Assim, as alterações histológicas das brânquias são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados nos peixes pela exposição a diferentes poluentes (PLAYLE *et al.*, 1992; ARELLANO *et al.*, 1999; DE BOECK *et al.*, 2001; GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007).

A organização geral das brânquias baseia-se em um sistema progressivo de subdivisões dando origem, primeiramente, às fendas branquiais, as quais são separadas por um septo branquial que contém o arco branquial (NOGUEIRA *et al.*, 2008). O epitélio que recobre este arco branquial é constituído por diversos tipos celulares e, em particular, por células pavimentosas de revestimento, células de cloro e mucosas (MONTEIRO *et al.*, 2004). Na superfície do arco branquial voltada para a cavidade opercular inserem-se duas fileiras de filamentos branquiais (holobrânquias), cujas superfícies dão origem a uma série de dobras que constituem as lamelas, as quais são os sítios primários das trocas de gases na maioria dos peixes (SAKURAGUI, 2000; GENTEN *et al.*, 2009).

O contato direto entre as brânquias e a água promove maior interação com as substâncias tóxicas encontradas na água, devido à presença dos sítios de ligações iônicas (HOLLIS; PLAYLE, 1997). A fina camada epitelial que cobre as lamelas secundárias representa o local de maior troca gasosa. As células de cloreto, responsáveis pelas trocas iônicas, estão concentradas, geralmente, na lamela primária, mas são encontradas entre as lamelas secundárias sob condições de baixas concentrações iônicas. Além de transportar sódio, cloro e cálcio, estas células podem eventualmente acumular metais tóxicos e outras substâncias, o que provoca uma alteração indicativa de resposta morfológica de proteção ao organismo, pois aumenta a barreira água-sangue aos poluentes tóxicos bio-disponíveis. Esta barreira pode fazer com que os peixes morram asfíxiados quando o espaço entre as lamelas secundárias, onde ocorrem trocas gasosas, se torna muito pequeno (FRACÁCIO *et al.*, 2003).

O fígado é um órgão chave para avaliação da ação dos poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e, provavelmente, também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros xenobióticos se acumulam no fígado, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes tanto no ambiente quanto em outros órgãos do peixe (HEATH, 1987). Devido à sua função no metabolismo de xenobióticos e à sua sensibilidade aos poluentes do ambiente, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes por agentes químicos

orgânicos e inorgânicos (HINTON *et al.*, 1992). Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992; GUNDERSEN *et al.*, 2000), pois, na presença de poluentes, o fígado pode desenvolver alterações histológicas que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos de contaminantes (GUNDERSEN *et al.*, 2000; AMORIM *et al.*, 2000; PARIS-PALÁCIOS *et al.*, 2000; SCHWAIGER, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; FANTA *et al.*, 2003). Por isso, alguns parâmetros hepáticos, como alterações histopatológicas e depleção de glicogênio, têm sido utilizados em programas de biomonitoramento (SCHWAIGER *et al.*, 1997; JOHNSEN *et al.*, 1998; PACHECO; SANTOS, 2002; FANTA *et al.*, 2003).

Desse modo foi proposto avaliar neste trabalho os efeitos de diferentes concentrações de Zn na histologia das brânquias e do fígado de lambaris (*A. aff. bimaculatus*) machos adultos, após exposição subcrônica, e avaliar a espécie como bioindicador de ambientes impactados.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), protocolo nº 95806/2009. Foram utilizados 65 machos de *A. aff. bimaculatus*, procedentes da Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, localizada na cidade de Viçosa-MG.

A pesquisa foi desenvolvida nos seguintes Laboratórios: Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária; Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral; Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal; Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, todos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados cinco aquários de vidro, cada um com capacidade de 150 L de água livre de cloro (por evaporação), mantendo-se 13 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 l/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos aquários era sifonado para eliminar restos de matéria orgânica e, imediatamente, substituído, mantendo-se as mesmas características iniciais. A qualidade da água foi monitorada a cada sete dias, medindo-se: o oxigênio dissolvido, a amônia tóxica, a dureza total e o nitrito através de *kits* colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH, pelo medidor

de pH digital de bancada (Tracom 10) e a condutividade elétrica, pelo condutivímetro digital de bancada (Tonka CD 820). Foram coletadas amostras de água a cada sete dias para determinação das concentrações de Zn através do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

A temperatura foi controlada (26 ± 1 °C) (FISHBASE, 2009) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W). O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro, controlado por temporizador. Os peixes tiveram alimentação diária *ad libitum* ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida 2 vezes ao dia, às 8 e às 17 horas. Essa ração apresenta-se em grânulos de 4 mm e, devido à incompatibilidade com o tamanho da cavidade bucal dos peixes, foi triturada e peneirada, utilizando-se peneira com malha de 1 mm.

Os animais foram expostos a concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn na água, que foram divididas durante o período experimental, de 30 dias. A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 µg L⁻¹ de Zn, fornecido na forma de ZnSO₄.7H₂O (Merck, n° 1.08883.1000). Foi constituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. Cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 13 repetições.

A partir do momento que foi observado mortalidade dos animais, no 15° dia experimental, foram feitas observações a cada hora para retirada dos animais mortos nesse intervalo. Estes animais foram submetidos aos mesmos procedimentos daqueles que sobreviveram até o final do tempo de exposição. Ao final do período experimental, os animais foram previamente anestesiados com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia, sendo então eutanasiados por secção da medula espinhal, ao nível do opérculo.

De cada exemplar foram registrados os seguintes dados: comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG), peso do fígado (PF), peso das brânquias (PB), peso dos fragmentos de músculos (PM), peso da cabeça (PCa) e peso dos fragmentos dos ossos (PO). Os pesos foram obtidos utilizando-se uma balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Scientech, AS 210). Para a medição, utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de 0,02 mm e, para a retirada dos tecidos, tesoura e bisturi cirúrgico. Para a histologia das brânquias, foram utilizados fragmentos da região mediana do segundo arco braquial, e para a histologia do fígado e dos testículos, as regiões medianas dos respectivos órgãos.

Foram retirados fragmentos de músculo, osso, testículos, fígado e brânquias para a determinação da concentração de Zn nestes tecidos através de espectrofotometria de absorção atômica.

Fragmentos de brânquias e fígado foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e depois transferidos para álcool 70%. Em seguida, foram desidratados em série etanólica crescente, com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicolmetacrilato (Historesin®, Leica).

Após a inclusão foram feitas, para as brânquias, secções seriadas, e, para os fragmentos de fígado, secções semi-seriadas, de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro.

As preparações de brânquias foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, e as de fígado foram coradas com hematoxilina de Mayer e Floxina B, montadas com Entellan® - Merck, e analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX-50). As imagens digitais foram obtidas utilizando fotomicroscópio Olympus AX70 TRF.

Para as análises histopatológicas das brânquias foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias, utilizando-se dez campos/animal: hiperplasia lamelar, redução de lamelas secundárias, fusão das lamelas primárias e secundárias, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, deleção de epitélio lamelar primário e secundário, ruptura celular, produção excessiva de muco, espessamento lamelar, vacuolização lamelar, destacamento de epitélio, edema, redução e aumento do espaço interlamelar, deformação da lamela primária e presença de tecido muscular.

Para as análises histopatológicas do fígado foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias, utilizando dez campos/animal: deslocamento de núcleo do hepatócito, necrose e desarranjo da estrutura cordonal, infiltrado leucocitário, vacuolização de hepatócitos, hepatócito com núcleo picnótico, citoplasma com granulação densa, degeneração nuclear, degeneração citoplasmática, proliferação e inchaço sinusóide, hipertrofia nuclear, hipertrofia celular e congestão vascular.

Morfometricamente foram quantificados pontos sobre núcleo e citoplasma de hepatócitos, capilar sinusóide e infiltrados leucocitários, totalizando 2660 pontos/animal com auxílio do programa para análise de imagem Image Pro Plus. Para determinação do diâmetro nuclear dos hepatócitos, foram medidos 30 núcleos/animal com auxílio do programa para análise de imagem Image Pro Plus.

Para obter a proporção do fígado em relação ao peso corporal foi calculado o índice hepatossomático (IHS) mediante a fórmula $IHS_1 = PF/PC \times 100$. Adicionalmente, para

verificar a influência do fígado sobre o índice hepatossomático, foi utilizada a fórmula: $IHS_2 = PF / (PC - PF) \times 100$, em que PF = Peso do Fígado e PC = Peso Corporal.

A presença de alterações histológicas das brânquias e do fígado, para cada organismo, foi avaliada de forma semi-quantitativa através do *Degree of Tissue Change* (Alteração Degradativa do Tecido – DTC), o qual foi baseado na severidade das lesões. Para o cálculo do DTC segundo POLËKSIC e MITROVIC-TUTUNDZIC (1994), as alterações são classificadas em estágios (ou fases) progressivas para cada tecido, que vão de I a III. Alterações do estágio I são consideradas leves, não alteram a função do tecido; alterações do estágio II são moderadas e alteram parcialmente a função do tecido; alterações do estágio III são severas e alteram totalmente a função do tecido. O valor do DTC foi calculado para cada animal utilizando-se a seguinte fórmula: $DTC = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$, onde I, II e III correspondem ao número de alterações dos estágios I, II e III, respectivamente. Os valores do DTC entre 0 a 10 indicam funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicam leves alterações; valores entre 21 e 50 indicam alterações moderadas no órgão; valores entre 51 e 100 indicam lesões severas no órgão e valores acima de 100 indicam alterações irreversíveis no órgão. Os resultados do DTC foram expressos em médias.

Os resultados das variações nos diâmetros nucleares de hepatócitos, dos constituintes do tecido hepático e índice hepatossomático foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de Newman-Keuls com $p \geq 0,05$. Os resultados das histopatologias das brânquias e do fígado foram analisados de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comprimento padrão e os pesos do fígado, dos testículos e da cabeça variaram significativamente entre os tratamentos e o controle (TAB. 1). No entanto, não foram observadas diferenças significativas no peso e altura corporal e peso das brânquias.

Tabela 1: Biometria corporal de machos de *A. aff. bimaculatus* (um grupo controle e quatro tratamentos) expostos a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.

Concentração de Zinco (mg L⁻¹)					
Padrões	0	5	10	15	20
PC (g)	5,437 ^a	6,811 ^a	10,311 ^a	7,085 ^a	6,536 ^a
CP (cm)	4,710 ^a	6,336 ^b	6,764 ^b	6,747 ^c	6,822 ^b
AC (cm)	2,280 ^a	2,063 ^a	2,194 ^a	2,152 ^a	2,311 ^a
PF (g)	0,044 ^a	0,039 ^{ab}	0,021 ^b	0,023 ^b	0,028 ^{ab}
PT (g)	0,053 ^a	0,157 ^b	0,180 ^b	0,197 ^b	0,204 ^b
PB (g)	0,184 ^a	0,183 ^a	0,209 ^a	0,223 ^a	0,208 ^a
PCa (g)	0,839 ^a	1,109 ^b	1,005 ^{ab}	1,055 ^b	0,993 ^b

Legenda: PC: Peso Corporal; CP: Comprimento Padrão; AC: Altura Corporal; PF: Peso do Fígado; PT: Peso dos Testículos; PB: Peso das Brânquias e PCa: Peso da Cabeça.

*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, $p \geq 0,05$

A qualidade da água avaliada durante o período experimental não diferiu significativamente ao longo do período nem entre os diferentes tratamentos, exceto com relação à condutividade elétrica, que aumentou à medida que a concentração de Zn na água aumentava (TAB. 1 - ANEXO A). Os resultados de pH, oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito encontravam-se dentro da faixa determinada como adequada para peixes de água doce (OSTRENSKY; BOEGER, 1998; MOREIRA *et al.*, 2001; ARANA, 2004). A condutividade elétrica acima de $100 \mu\text{S cm}^{-1}$ está associada, em geral, a ambientes impactados fornecendo assim uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece qualquer indicação das quantidades relativas dos vários componentes. À medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados, a condutividade da água aumenta e altos valores podem indicar características corrosivas da água (CETESB, 2009).

A concentração de Zn dos aquários foi monitorado a cada sete dias. Constatou-se que as concentrações deste elemento sofreram aumento gradativo durante os 30 dias de exposição. No entanto, a adição diária de Zn, embora tenha ocasionado aumento na concentração do mesmo em solução, não atingiu os valores definidos nos tratamentos. Provavelmente, processos adsortivos nas paredes dos recipientes ou com material em suspensão tenham colaborado para que as concentrações definidas nos tratamentos não tenham sido alcançadas.

No grupo controle e no grupo tratado com concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn não houve mortalidade dos peixes até o final do experimento. Entre o 15° e o 28° dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

A morte dos peixes foi precedida de comportamento anormal, permanecendo próximos à superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia. Aqueles que sobreviveram reduziram a ingestão de alimento. Por outro lado, os animais que não receberam o Zn e aqueles que receberam o metal na concentração de 5 mg L⁻¹, movimentavam-se intensamente em cardumes e se alimentavam normalmente, mostrando comportamento semelhante ao grupo de controle.

Tabela. 2: Percentual da mortalidade de *A. aff. bimaculatus* durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco (n = 13)

Concentração de zinco (mg L ⁻¹)	Mortalidade (%)					Total
	Tempo (dias)					
	14	20	25	28	30	
0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
10	0	24	18	20	0	62
15	0	23	27	35	0	85
20	0	26	32	42	0	100

Trabalho realizado por SANTOS (2009) utilizando-se *A. aff. bimaculatus* sob exposição aguda (96 h), verificou-se que não houve mortalidade em concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn, enquanto que na concentração de 20 mg L⁻¹ ocorreu 100% de mortalidade em apenas 24 horas. A concentração letal para 50% dos organismos (CL50) na exposição aguda (96 horas), para *A. aff. bimaculatus*, foi determinada como sendo de 10 mg L⁻¹ de Zn, o dobro do permitido pela legislação brasileira (5 mg L⁻¹) na água para criação de animais (CONAMA, 2005), indicando o alto nível de toxicidade do Zn para a espécie em estudo.

A estrutura geral das brânquias do grupo controle apresentou-se com distribuição normal dos constituintes celulares e padrão de organização das lamelas primárias, secundárias e vasos sanguíneos, conforme exposto na FIG. 1. Nos animais tratados foram encontradas as seguintes alterações branquiais: hiperplasia, redução de lamelas secundárias, fusão das lamelas primárias e secundárias, aneurisma, destruição do epitélio

lamelar, deleção de epitélio lamelar primário e secundário, ruptura celular, produção excessiva de muco, espessamento lamelar, vacuolização lamelar, destacamento de epitélio, edema, redução e aumento do espaço interlamelar, deformação da lamela primária e presença de tecido muscular (FIG. 3, 4, 5, 6).

As principais mudanças estruturais induzidas por substâncias tóxicas e outros produtos químicos na estrutura das brânquias dos peixes e as lesões mais comuns são necrose, hiperplasia, hipertrofia e ruptura de tecidos das brânquias, fusão lamelar, hipersecreção e proliferação de células mucosas, alterações nas células do cloreto e vascularização (MALLAT, 1985). Tais alterações também foram observadas como resultado da ação de endossulfan (NOWAK, 1992) e tri-n-butiltina (GRINWIS *et al.*, 1997).

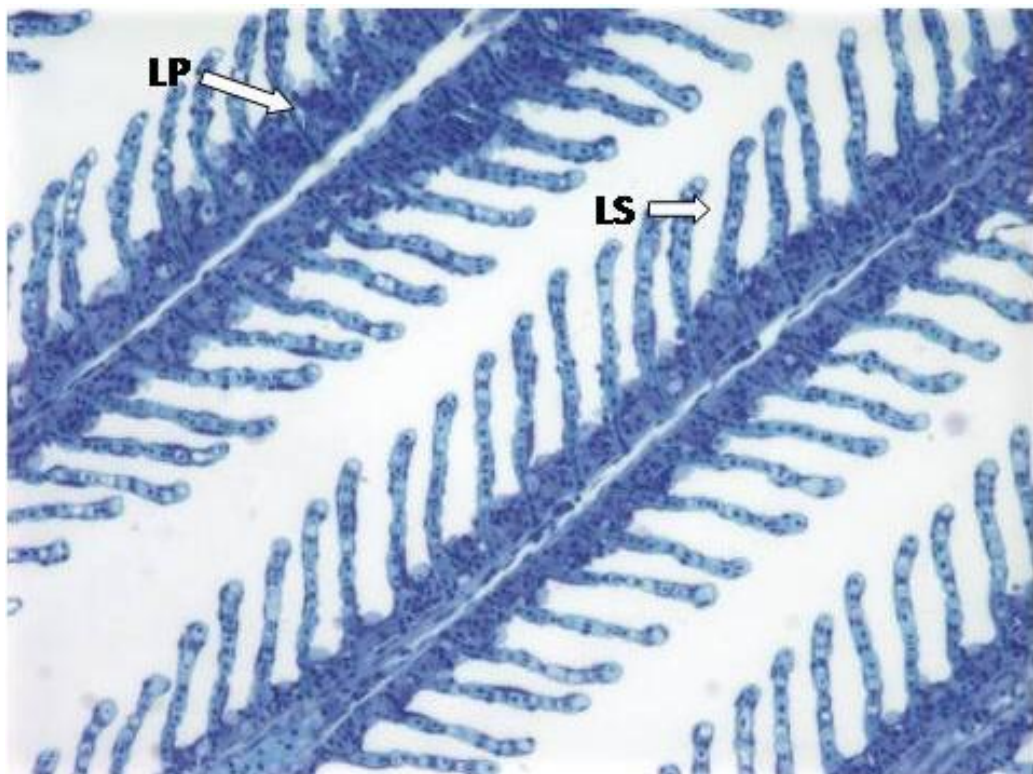


Figura 1: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* do grupo controle. (LP) lamela primária, (LS) lamela secundária. Note o padrão de organização das células nas lamelas secundárias. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 450x.

Todos os grupos tratados obtiveram valores do *Degree of Tissue Change* (DTC) superiores a 100, com média 582 ± 28 , indicando a presença de alterações irreversíveis nas brânquias (FIG. 2). Estudos com peixes coletados em áreas urbanas já relataram valores do DTC para as brânquias variando de 3,6 a 13, 2, com média de 9,8, o que estaria associado ao funcionamento normal do órgão (CAMARGO; MARTINEZ, 2007). De acordo com as

médias gerais obtidas para cada grupo, entre as alterações patológicas do estágio I, a deformação da lamela primária foi a que apresentou com maior frequência em todos os grupos. Esta alteração foi seguida por hiperplasia, fusão lamelar, redução do espaço interlamelar secundário, produção excessiva de muco e aumento do espaço interlamelar secundário. A ruptura celular foi a alteração patológica que prevaleceu em todos os grupos em relação ao estágio II, seguida pelo aneurisma, fusão lamelar, edema, vacuolização lamelar e tecido muscular. No estágio III, a destruição do epitélio lamelar foi a alteração que obteve a maior média em todos os grupos, seguida pela deleção do epitélio lamelar secundário, redução da lamela secundária, deleção do epitélio lamelar primário, destacamento de epitélio, união de filamentos e espessamento lamelar (TAB. 3).

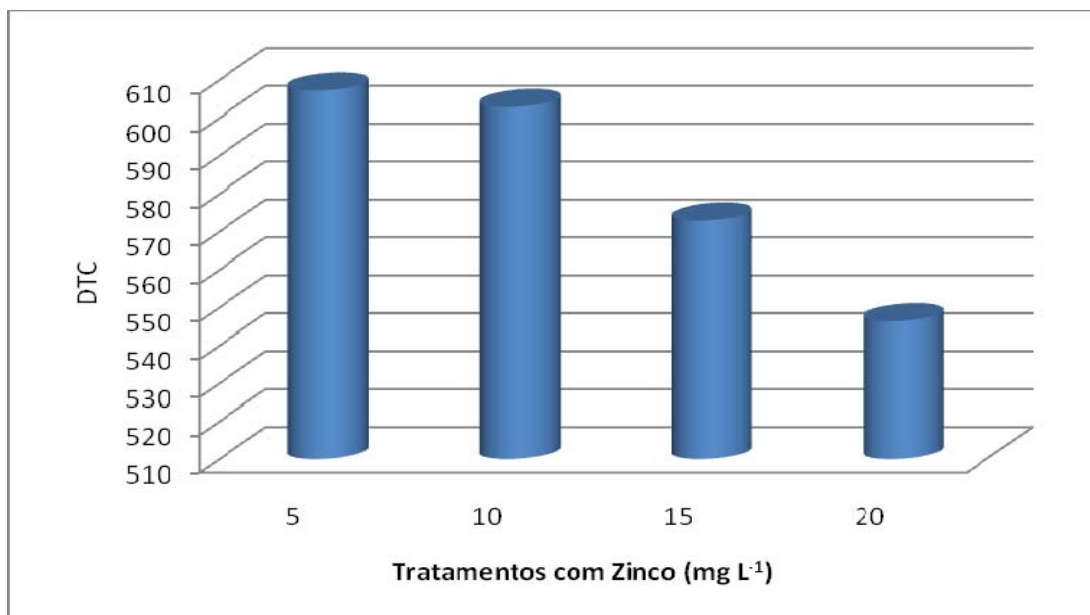


Figura 2: Valores médios do *Degree of Tissue Change* (DTC) nas brânquias de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

Tabela 3: Divisão em estágios (modificado por CONDESSA, 2009) e percentual da média geral das alterações histopatológicas das brânquias detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L^{-1} , 15 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1} apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

ESTÁGIOS	HISTOPATOLOGIAS	MÉDIA GERAL (%)
I	Hiperplasia	82,90
	Aumento do espaço interlamelar secundário	18,66
	Deformação da lamela primária	88,12
	Produção excessiva muco	42,84
	Redução do espaço interlamelar secundário	76,47
II	Aneurisma	84,63
	Fusão lamelar	82,24
	Ruptura celular	85,49
	Vacuolização lamelar	51,47
	Edema	65,98
	Tecido muscular	3,28
III	Redução da lamela Secundária	37,44
	Destruição do epitélio lamelar	89,52
	Deleção do epitélio lamelar secundário	54,02
	Espessamento lamelar	7,07
	Deleção do epitélio lamelar primário	33,79
	Destacamento de epitélio	19,45
	União de filamentos	16,87

Constatou-se que 98% dos animais tratados com 5 mg L^{-1} de Zn apresentaram deformação da lamela primária, seguido de aneurisma, ruptura celular, hiperplasia, destruição do epitélio lamelar e redução do espaço interlamelar. No tratamento com 10 mg L^{-1} de Zn, 93% dos animais apresentaram deformação da lamela primária, seguida de aneurisma, destruição do epitélio lamelar, hiperplasia e ruptura celular (TAB. 4 – FIG. 3, 4, 5, 6). Observou-se ruptura celular no epitélio branquial em todos os grupos tratados, mas, nos grupos que receberam 5 e 10 mg L^{-1} de Zn, encontraram-se as maiores porcentagens, 87% e 86% , respectivamente (FIG. 3, 4, 5, 6). Este tipo de patologia está associado às lesões que refletem o efeito direto dos poluentes (TEMMINK *et al.*, 1983) e que ocorrem em condições de maior toxicidade (ABEL *et al.*, 1976). O maior índice desta patologia nos grupos em estudo pode ser explicado pelo período que estes animais ficaram expostos ao Zn, já que todos os peixes que receberam 5 mg L^{-1} de Zn sobreviveram até o final do experimento, e somente 38% e 15% dos animais que receberam 10 e 15 mg L^{-1} de Zn sobreviveram os 30 dias. Já os peixes do grupo tratado com 20 mg L^{-1} , morreram antes de completar os 30 dias, não apresentando tempo suficiente para adquirir maiores índices de ruptura celular (Figuras 3, 4, 5, 6). A presença de ruptura celular no epitélio branquial em

tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) expostas ao cádmio já foi verificada por meio de estudo realizado por GARCIA-SANTOS *et al.* (2007).

A dilatação do eixo vascular das lamelas foi observada em todos os grupos tratados. Nos grupos tratados com 5 e 10 mg L⁻¹ de Zn, verificou-se uma percentagem maior do que nos outros grupos. Este fato conduziu à ruptura das células pilares, com perda da capacidade de suporte e, conseqüentemente, levou ao aparecimento de aneurismas lamelares. Esta dilatação do eixo vascular das lamelas também foi observada em estudo realizado com *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Zn em dosagens agudas (SANTOS, 2009). Resultados similares foram observados em *L. calcarifer* quando submetidos à exposição ao cádmio (THOPHON *et al.*, 2003).

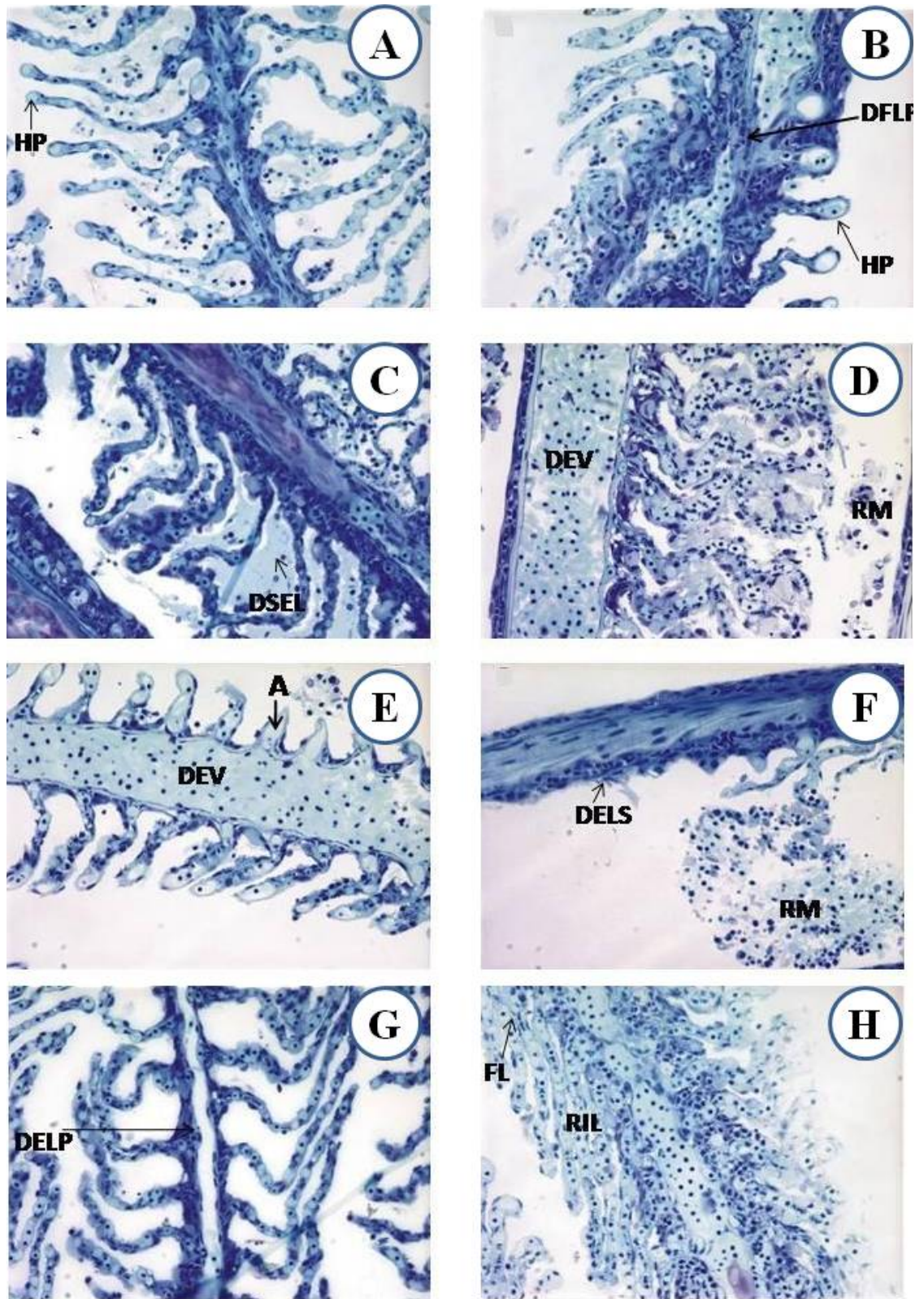


Figura 3: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 5 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (HP) hiperplasia; (DEV) dilatação do eixo vascular; (DELP) deleção do epitélio lamelar primário; (FL) fusão lamelar; (RIL) redução do espaço interlamelar; (RC) ruptura celular; (DELS) deleção do epitélio lamelar secundário; (DFLP) deformação da lamela; (A) aneurisma; (DSEL) destruição do epitélio lamelar primário. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

Observou-se, no grupo tratado com 15 mg L⁻¹ de Zn, destruição do epitélio lamelar em 92% dos peixes, seguida pela deformação da lamela primária, ruptura de membrana, hiperplasia, fusão lamelar e edema. No tratamento de 20 mg L⁻¹, também foi observado em 92% dos animais a destruição do epitélio lamelar, seguido de edema, fusão lamelar, vacuolização lamelar, ruptura de membrana e aneurisma (TAB. 4 - FIG. 3, 4, 5, 6). Em estudo anterior, verificou-se que no tratamento que recebeu 3 mg L⁻¹ de Zn, houve 83% de destruição do epitélio lamelar e, nos tratamentos subsequentes, essa destruição foi de 100% (SANTOS, 2009).

A deleção do epitélio lamelar secundário, consequência da destruição das lamelas secundárias, aumentou gradualmente de acordo com o aumento das concentrações de Zn nos grupos tratados (TAB. 4 - FIG. 3, 4, 5, 6). O grupo que recebeu 15 mg L⁻¹ de Zn apresentou 51% de deleção das lamelas secundárias, indicando toxicidade para os animais e comprometimento das funções vitais das brânquias, o que explica a mortalidade de 85% dos peixes desse grupo em 30 dias. O grupo que recebeu 20 mg L⁻¹ de Zn apresentou 85% de deleção das lamelas secundárias, levando à morte de todos os peixes no período de 28 dias. SANTOS (2009) verificou que no tratamento onde os peixes (*A. aff. bimaculatus*) foram expostos a 5 mg L⁻¹ de Zn, a deleção das lamelas secundárias foi de 50% e nos grupos de 10 e 15 mg L⁻¹, a percentagem de deleção lamelar secundária foi de 83%. O tratamento de 20 mg L⁻¹ de Zn causou deleção lamelar secundária de 91% das brânquias (SANTOS, 2009) causando a morte de todos os animais.

A proliferação do epitélio lamelar levou à fusão parcial e total das lamelas secundárias nos grupos que receberam concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn. A partir da concentração de 10 mg L⁻¹, a fusão de lamelas foi igual ou superior a 80%, indicando que os peixes sofreram interferência no sistema respiratório causadas pela exposição ao metal. Já foi comprovada, em estudos com *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Zn em dosagens agudas, a proliferação do epitélio lamelar, levando à fusão parcial e total das lamelas secundárias, em grupos que receberam concentração acima de 3 mg L⁻¹, e a partir do grupo com 5 mg L⁻¹, a fusão de lamelas foi de 100% (SANTOS, 2009). A exposição ao cádmio induz apenas a proliferação do epitélio filamentar, a qual conduz, por vezes, à fusão parcial ou total das lamelas branquiais (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007). Resultados idênticos foram observados em *Lates calcarifer* submetido ao cádmio (THOPHON *et al.*, 2003) e, também, em tilápia nilótica exposta ao cobre (MONTEIRO, 2001; MONTEIRO *et al.*, 2005).

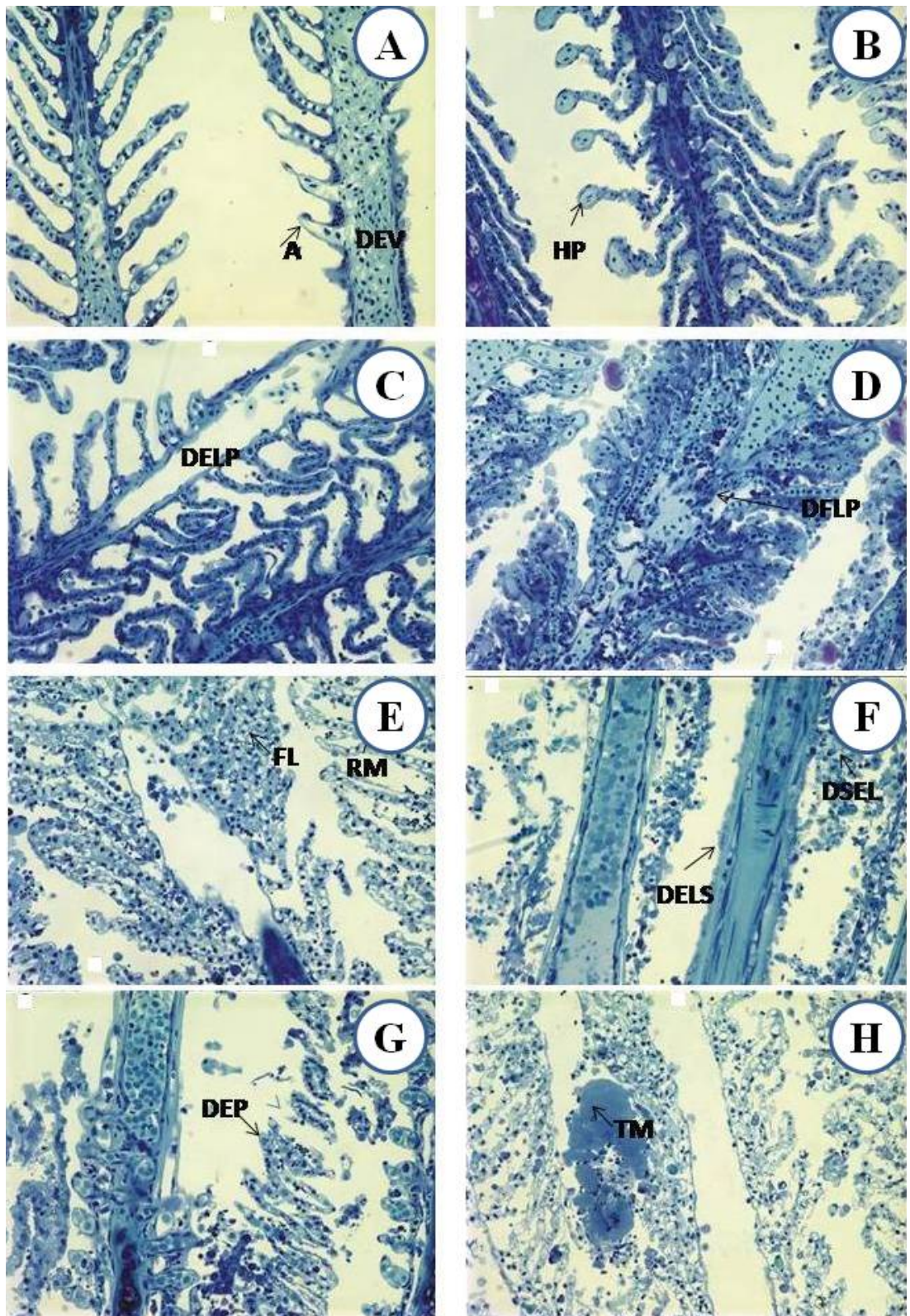


Figura 4: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 10 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (HP) hiperplasia; (DEV) dilatação do eixo vascular; (DELP) deleção do epitélio lamelar primário; (FL) fusão lamelar; (RC) ruptura celular; (DELS) deleção do epitélio lamelar secundário; (DFLP) deformação da lamela; (A) aneurisma; (DSEL) destruição do epitélio lamelar primário; (TM) tecido muscular; (DEP) destacamento de epitélio; (DFLP) deformação da lamela primária. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

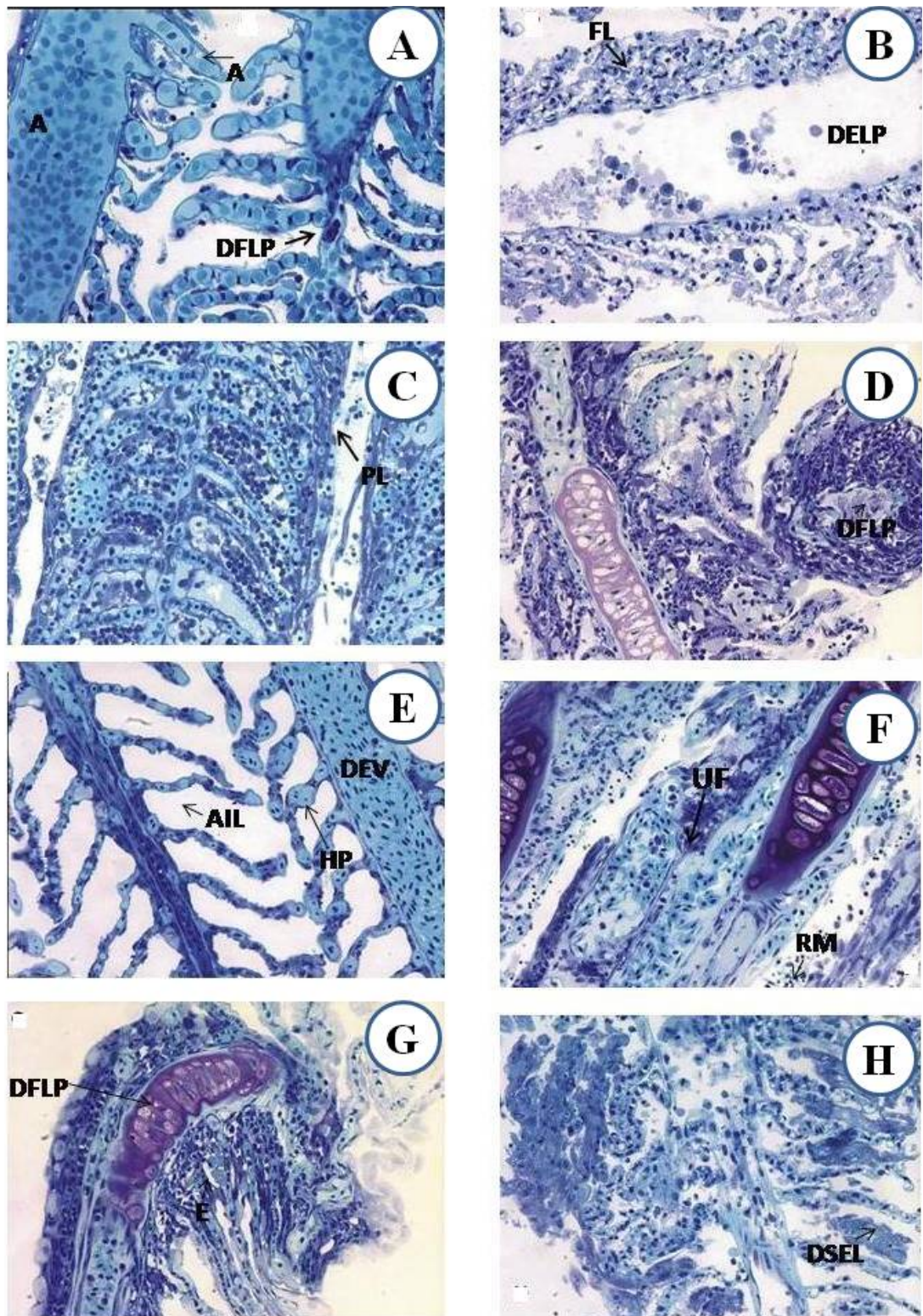


Figura 5: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 15 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (HP) hiperplasia; (DEV) dilatação do eixo vascular; (DELP) deleção do epitélio lamelar primário; (FL) fusão lamelar; (RC) ruptura celular; (A) aneurisma; (DSEL) destruição do epitélio lamelar primário; (DFLP) deformação da lamela primária; (PL) espessamento lamelar; (AIL) aumento do espaço interlamelar; (UF) união filamentar. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

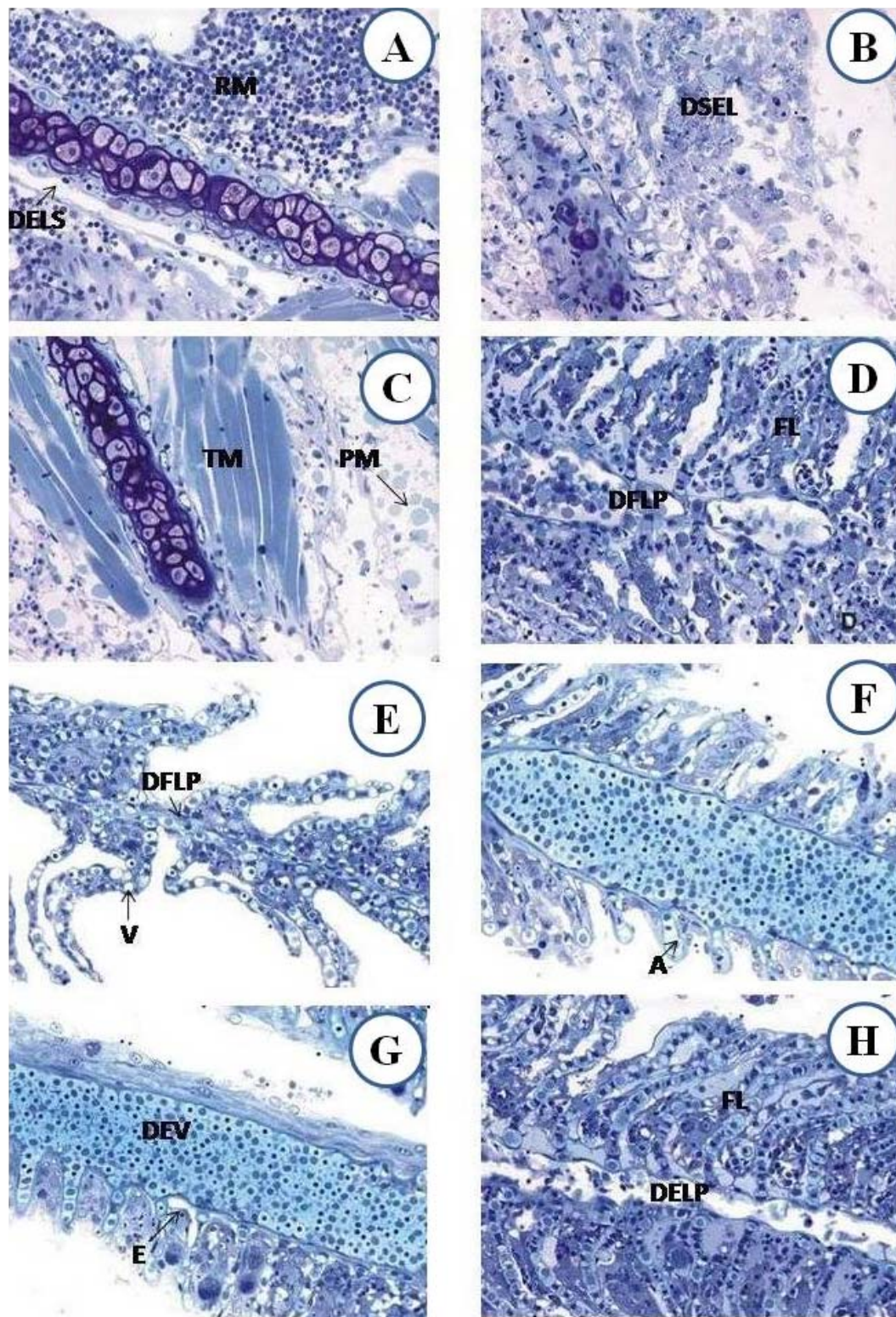


Figura 6: Fotomicrografias da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 20 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (DEV) dilatação do eixo vascular; (DELP) deleção do epitélio lamelar primário; (FL) fusão lamelar; (RC) ruptura celular; (A) aneurisma; (DSEL) destruição do epitélio lamelar primário; (DFLP) deformação da lamela primária; (TM) tecido muscular; (DELS) deleção do epitélio lamelar secundário; (PM) produção excessiva de muco; (E) edema. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

Outras lesões observadas foram edema intersticial, o destacamento epitelial, a proliferação do epitélio filamentar e a fusão de lamelas. Segundo alguns autores essas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa, porque diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (KARLSSON-NORRGREN *et al.*, 1985; ERKMEN; KOLANKAYA, 2000). Essas respostas dificultam o acesso do poluente ao sangue prejudicando, contudo, a realização de trocas gasosas (McDONALD; WOOD, 1993).

Tabela 4: Percentual de alterações histopatológicas das brânquias detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L^{-1} , 15 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1} apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

ESTÁGIOS	HISTOPATOLOGIAS	CONCENTRAÇÃO DO ZINCO (mg L^{-1})				
		0	5	10	15	20
I	Hiperplasia	0,0	87,27	86,88	84,12	73,33
	Aumento do espaço interlamelar secundário	0,0	44,55	16,47	12,50	1,11
	Deformação da lamelar primário	0,0	98,89	93,75	85,29	74,55
	Produção excessiva muco	0,0	16,36	48,82	50,63	55,56
	Redução do espaço interlamelar secundário	0,0	84,38	80,59	80,00	60,91
II	Aneurisma	0,0	89,38	88,24	80,91	80,00
	Fusão lamelar	0,0	77,78	79,41	83,64	88,13
	Ruptura celular	0,0	87,78	86,36	84,71	83,13
	Vacuolização lamelar	0,0	38,18	38,75	41,18	87,78
	Edema	0,0	34,55	55,29	81,88	92,22
	Tecido muscular	0,0	0,00	0,63	4,71	7,78
III	Redução da lamela secundária	0,0	26,67	34,55	35,63	52,94
	Destruição do epitélio lamelar	0,0	84,44	88,18	92,50	92,94
	Deleção do epitélio lamelar secundário	0,0	37,50	41,76	51,82	85,00
	Espessamento lamelar	0,0	2,22	8,24	8,75	9,09
	Deleção do epitélio lamelar primário	0,0	30,00	31,82	33,33	40,00
	Destacamento de epitélio	0,0	10,00	21,76	19,38	26,67
	União de filamentos	0,0	8,18	12,35	22,50	24,44

Os fígados dos peixes do grupo controle apresentaram hepatócitos com forma arredondada, citoplasma acidófilo, núcleo central com um ou dois nucléolos e organização cordonal das células. Os sinusóides apresentaram-se repletos de sangue, porém sem caracterizar congestão vascular (FIG. 7).

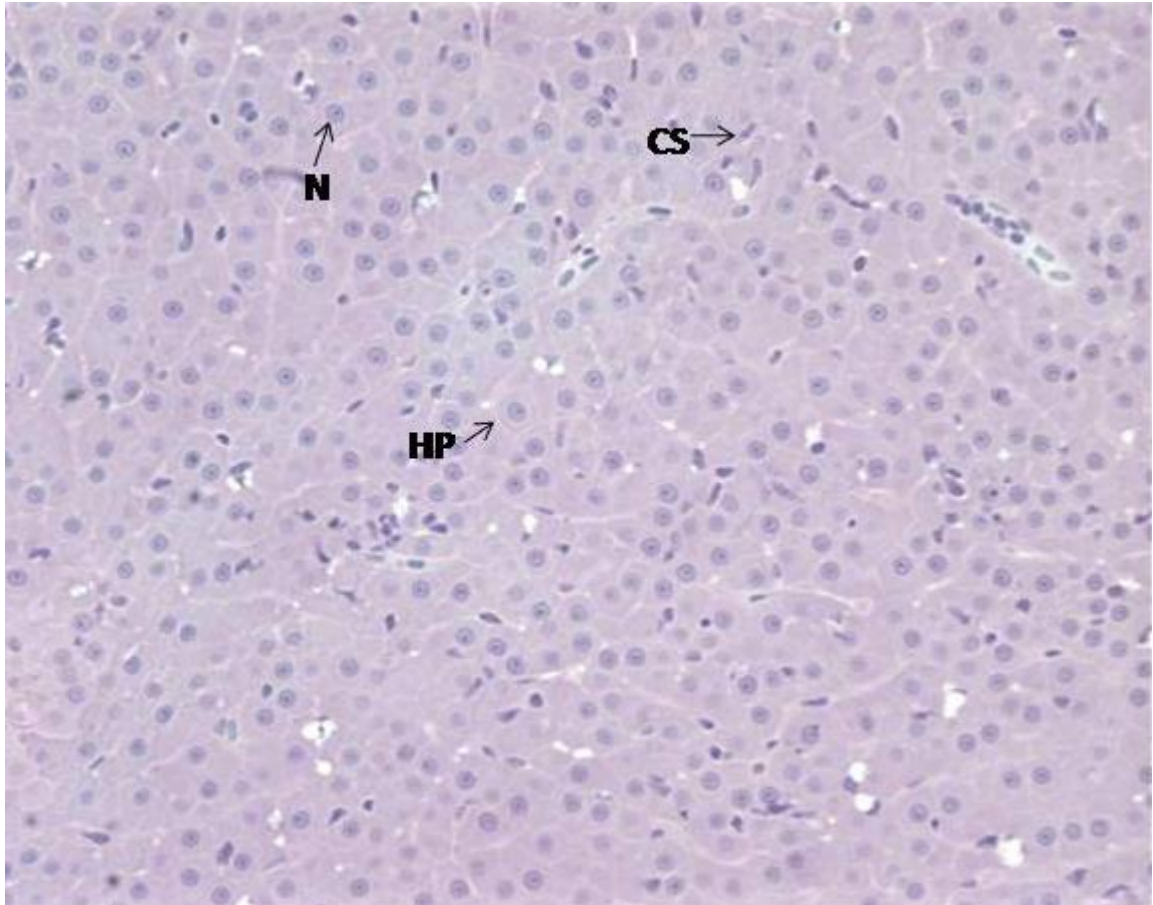


Figura 7: Fotomicrografias da organização histológica do tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* do grupo controle. (N) núcleo de hepatócito; (CS) capilar sinusóide; (HP) hepatócito. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B. Aumento: 450x.

Nos grupos tratados foram encontradas as seguintes alterações: hipertrofia nuclear, deslocamento de núcleo do hepatócito, hipertrofia celular, citoplasma com granulação densa, degeneração nuclear, degeneração citoplasmática, hepatócito com núcleo picnótico, vacuolização celular, desarranjo da estrutura cordonal, necrose, congestão vascular, infiltrado leucocitário, proliferação e inchaço sinusóide. Estudos sobre indicadores histopatológicos em peixes salientaram que as alterações histopatológicas mais severas observadas no fígado são mais frequentes nos indivíduos de áreas contaminadas, embora também ocorram em menor frequência em indivíduos de áreas menos degradadas (SCHWAIGER *et al.*, 1997).

Todos os grupos tratados obtiveram valores de DTC superiores a 100, com média 440 ± 10 , indicando a presença de alterações irreversíveis no tecido hepático (FIG. 8). Estudo já realizado com peixes coletados em áreas urbanas constatou que a média do DTC para o fígado foi 52, indicando alterações severas no tecido (CAMARGO; MARTINEZ, 2007).

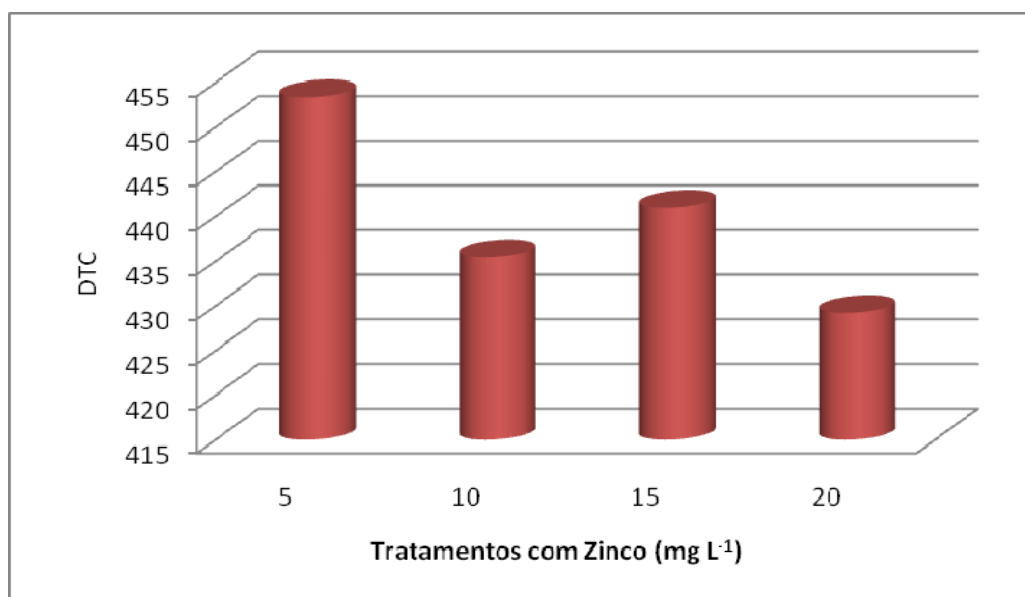


Figura 8: Valores médios do *Degree of Tissue Change* (DTC) tecido hepático de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

Tabela 5: Divisão em estágios (modificado por CONDESSA, 2009) e percentual da média geral das alterações histopatológicas do tecido hepático detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L⁻¹) na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

ESTÁGIO	HISTOPATOLOGIAS	MÉDIA GERAL (%)
I	Hipertrofia nuclear	43,2
	Deslocamento de núcleo do hepatócito	99,0
	Hipertrofia Celular	43,0
	Citoplasma com granulação densa	42,5
II	Degeneração nuclear	79,8
	Degeneração Citoplasmática	68,0
	Hepatócito com núcleo picnótico	87,0
	Vacuolização	81,0
	Desarranjo da Estrutura cordonal	54,8
III	Necrose	92,5
	Congestão Vascular	87,7
	Infiltrado leucocitário	89,4
	Proliferação e Inchaço sinusóide	24,4

Das alterações patológicas que constituem o estágio I, o deslocamento de núcleo do hepatócito foi a que se apresentou em maior quantidade em todos os grupos, seguido por hipertrofia nuclear, hipertrofia celular e citoplasma com granulação densa. Hepatócito com núcleo picnótico foi a alteração patológica que prevaleceu em todos os grupos, em relação ao estágio II, seguida pela vacuolização, degeneração nuclear, degeneração citoplasmática e desarranjo da estrutura cordonal. No estágio III, a necrose foi a que obteve a maior média em todos os grupos, seguida pelo infiltrado leucocitário, congestão vascular, proliferação e inchaço sinusóide (TAB. 5 – FIG. 9, 10, 11 e 12). O fígado dos teleósteos é um órgão multifuncional responsável pela conversão do alimento, produção da vitelogenina durante o crescimento gonadal e desintoxicação de compostos estranhos (STEGEMAN; LECH, 1991). Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio, inflamação, alteração no formato dos vasos sinusóides e neoplasmas podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, consideradas como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (THOMAS, 1990; KÖHLER *et al.*, 1992; TEH *et al.*, 1997).

Observou-se necrose e vacuolização nos grupos tratados com 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn. No grupo com 5 mg L⁻¹, 82% dos peixes apresentaram necrose. Nos grupos com 10, 15 e 20 mg L⁻¹, 92%, 95% e 100% dos animais apresentaram esta patologia, respectivamente (TAB. 6 – FIG. 9, 10, 11 e 12). A necrose pode ser caracterizada por alterações nucleares e citoplasmáticas, seguidas de perda dos limites celulares (ROBERTS, 1989). Ao ocorrer necrose de uma célula há liberação de sinalizadores que induzem a proliferação celular para a substituição das células mortas para retornar à condição estrutural e funcional do tecido. Este tipo de lesão causa prejuízos estruturais e funcionais no fígado de peixes (STENTIFORD *et al.*, 2003), diminuindo a funcionalidade, podendo causar a falência do órgão e, conseqüentemente, afetar maiores níveis de organização biológica (RABITTO *et al.*, 2005). A necrose ainda pode levar a degeneração de proteínas estruturais na membrana dos hepatócitos, podendo trazer problemas teciduais, pois as proteínas estruturais de membrana mantêm o parênquima hepático como um tecido compacto e homogêneo (PACHECO; SANTOS, 2002). Para outros metais pesados, como por exemplo, o cobre causou alterações, como necrose e vacuolização, no fígado de tilápias (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2007) e estas alterações foram mais evidentes nos peixes expostos às concentrações mais elevadas de cobre. Estas patologias estão associadas frequentemente às condições necróticas-degenerativas (MYERS *et al.*, 1987). Diversos estudos mostram variedades de alterações no fígado de *O. niloticus*, resultado da exposição

a diferentes produtos químicos e tóxicos (VISOOTTIVISETH *et al.*, 1999; FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2006). A acumulação crônica de cobre no fígado dos peixes causa lise, cirrose e morte do hepatócito (POURAHAMAD; O' BRIEN, 2000; VARANKA *et al.*, 2001).

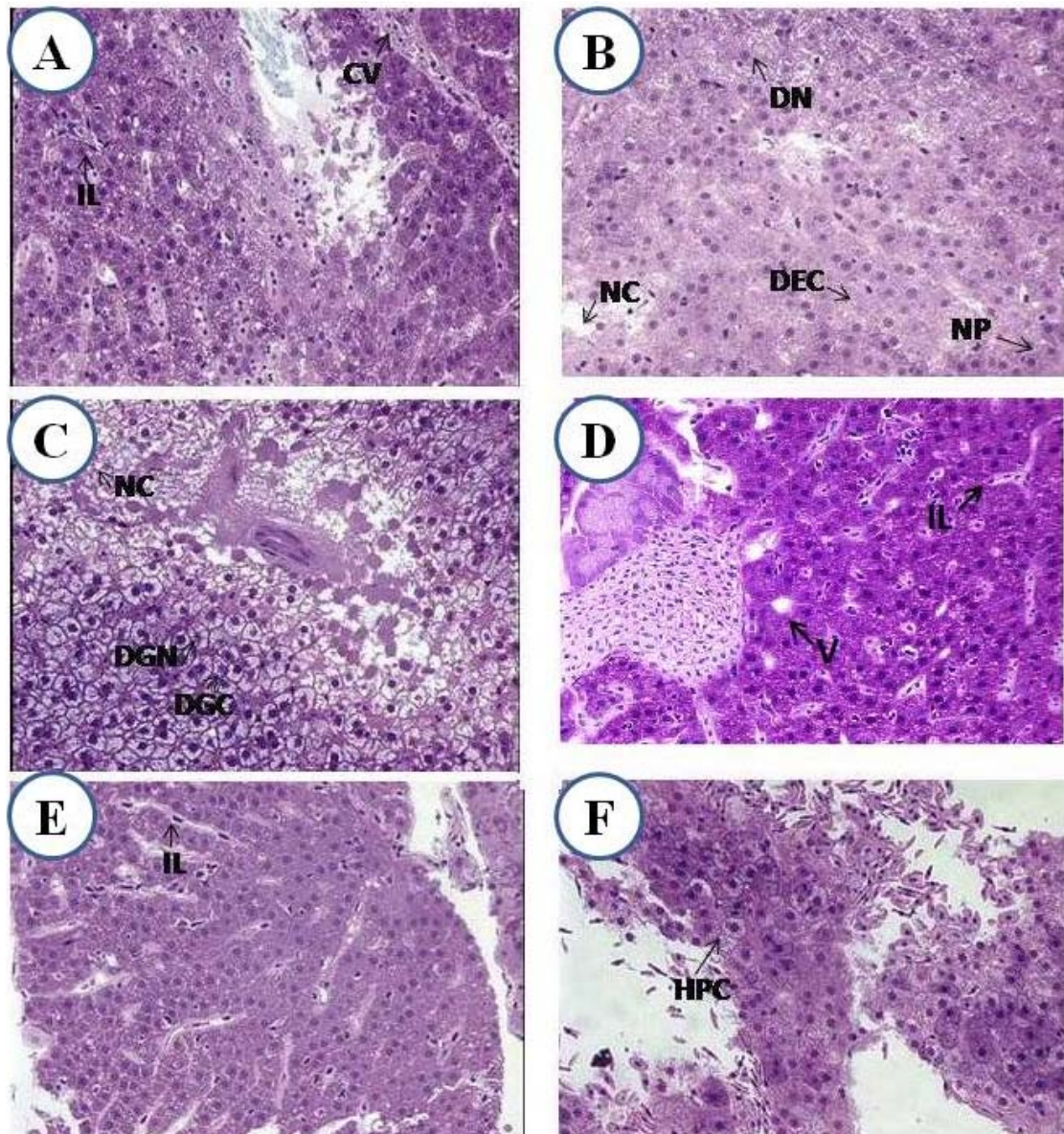


Figura 9: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 5 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (HPC) hipertrofia celular; (IL) infiltrado leucocitário; (NC) necrose, (DGN) degeneração nuclear; (DGC) degeneração citoplasmática; (CV) congestão vascular; (V) vacuolização; (DEC) desarranjo da estrutura cordonal; (NP) núcleo picnótico; (DN) deslocamento do núcleo. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B. Aumento: 280x.

O desarranjo da estrutura cordonal hepática foi observado em todos os peixes dos tratamentos contendo 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de zinco. Nos tratamentos superiores a 10 mg L⁻¹ essa patologia foi de 60% (TAB. 6 – FIG. 9, 10, 11 e 12). Essas alterações podem indicar a degeneração dos processos intracelulares dos hepatócitos, pois o fígado realiza importantes funções no processo de desintoxicação do animal (DUTTA *et al.*, 1993; HASCHEK *et al.*, 2002). Verificou-se que em tratamentos contendo 48 e 54 mg L⁻¹ de cobre ocorreu o deslocamento dos grânulos de glicogênio de regiões próximas das veias centrais, para o interior do hepatopâncreas, ocasionando o desarranjo da organização cordonal dos hepatócitos (HENARES, 2008). A desorganização do arranjo cordonal também foi observada em bagre (*Heteropneustes fossilis*) exposto ao malation (DUTTA *et al.*, 1993) e em dourada (*Sparus auratus*), exposta ao detergente dodecil sulfato de sódio (RIBELLES *et al.*, 1995). Estudo recente verificou a ocorrência de desorganização da estrutura cordonal em *A. aff. bimaculatus* expostos ao Zn, em dosagens agudas de 3, 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹, sendo que essa patologia foi de 70% nos tratamentos superiores a 5 mg L⁻¹ (SANTOS, 2009).

Tabela 6: Percentual de alterações histopatológicas do tecido hepático detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L⁻¹) na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

ESTÁGIO	HISTOPATOLOGIAS	CONCENTRAÇÃO DO ZINCO (mg L ⁻¹)				
		0	5	10	15	20
I	Hipertrofia nuclear	0,0	20,0	46,4	46,5	60,0
	Deslocamento de núcleo do hepatócito	0,0	98,2	98,2	99,4	100,0
	Hipertrofia Celular	0,0	13,5	46,4	51,1	61,2
	Citoplasma com granulação densa	0,0	0,0	40,6	62,2	67,1
II	Degeneração nuclear	0,0	59,4	81,8	86,7	91,2
	Degeneração Citoplasmática	0,0	41,2	73,6	77,1	80,0
	Hepatócito com núcleo picnótico	0,0	81,2	83,3	88,2	95,3
	Vacuolização de hepatócitos	0,0	75,9	77,3	84,4	86,5
	Desarranjo da Estrutura cordonal	0,0	38,8	57,3	60,0	62,9
III	Necrose	0,0	82,7	91,8	95,6	100,0
	Congestão Vascular	0,0	71,1	87,1	92,7	100,0
	Infiltrado leucocitário	0,0	64,5	95,6	98,2	99,4
	Proliferação e Inchaço sinusóide	0,0	16,7	18,2	21,8	40,9

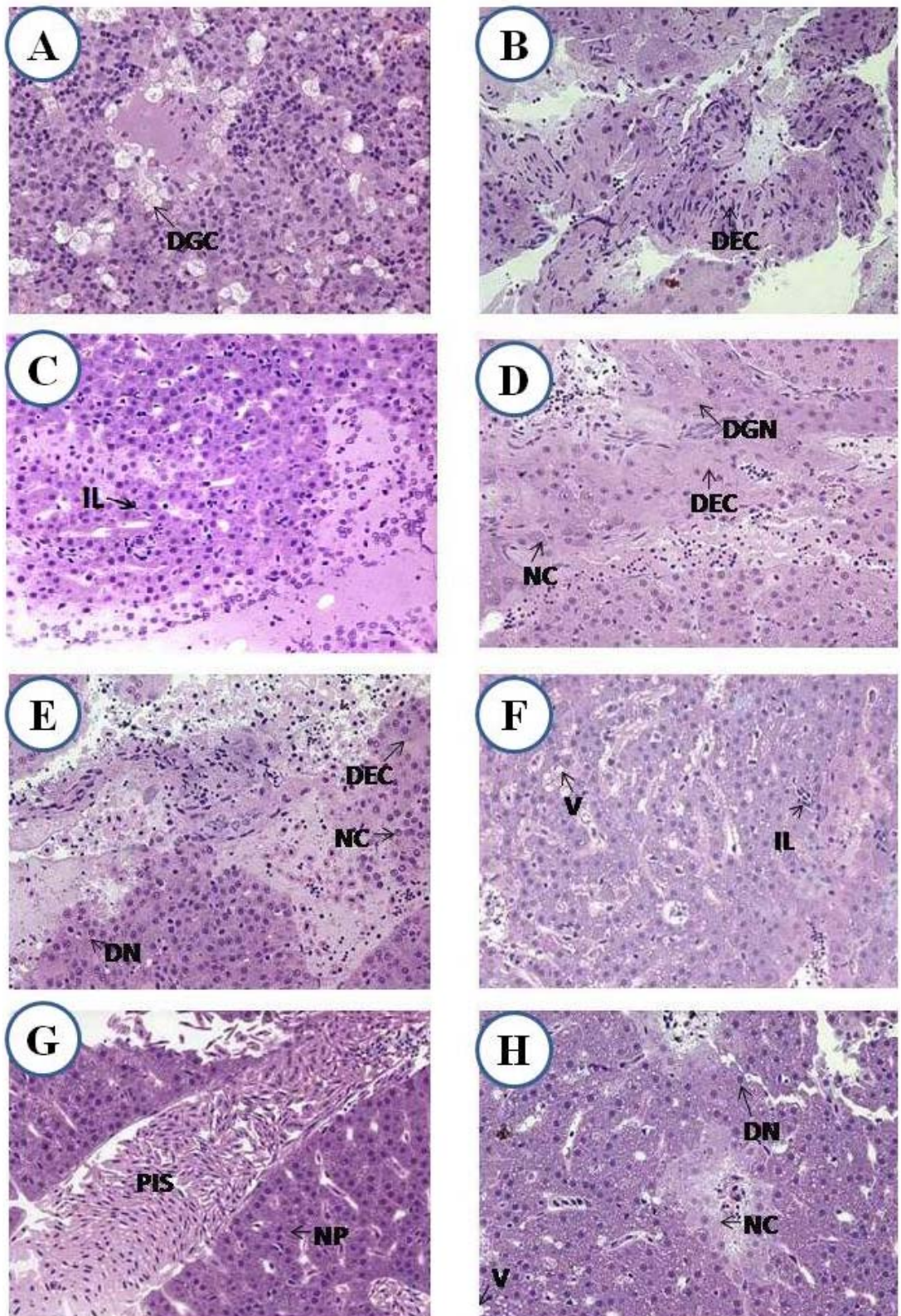


Figura 10: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 10 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (IL) infiltrado leucocitário; (NC) necrose; (DGN) degeneração nuclear; (DGC) degeneração citoplasmática; (V) vacuolização; (DEC) desarranjo da estrutura cordonal; (NP) núcleo picnótico; (DN) deslocamento do núcleo; (PIS) proliferação e inchaço sinusóide. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B. Aumento: 280x.

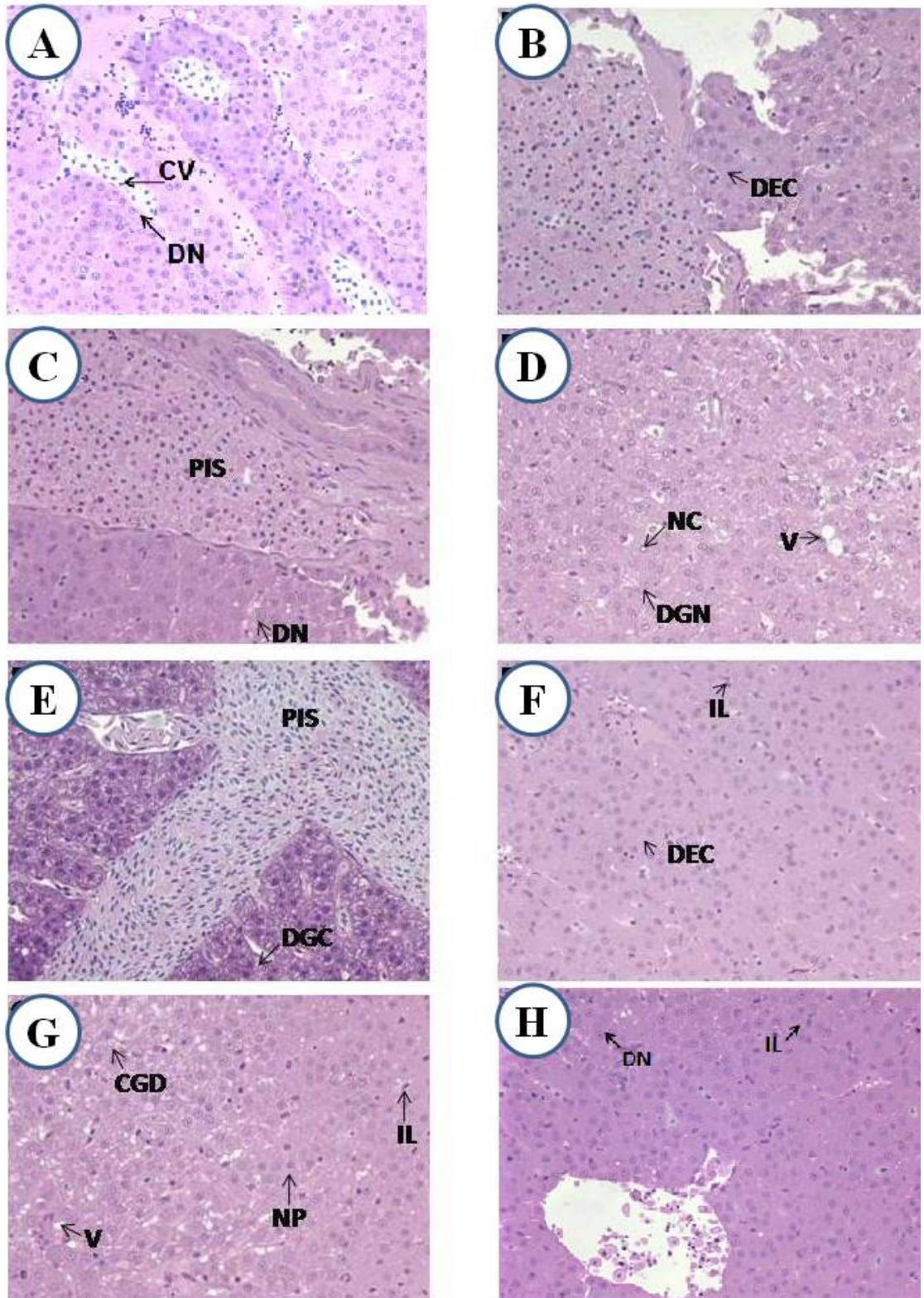


Figura 11: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 15 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (IL) infiltrado leucocitário; (NC) necrose; (DGN) degeneração nuclear; (DGC) degeneração citoplasmática; (V) vacuolização; (DEC) desarranjo da estrutura cordonal; (NP) núcleo picnótico; (DN) deslocamento do núcleo; (CV) congestão vascular; (PIS) proliferação e inchaço de sinusóide; (CGD) citoplasma com granulação densa. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B. Aumento: 280x.

Observou-se que, nos grupos tratados com 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn, o citoplasma da maioria das células hepáticas perdeu o padrão de coloração normal e adquiriu uma granulação desigual, o que pode reduzir a eficiência do fígado e prejudicando o funcionamento de outros órgãos, podendo causar a morte do animal (FIG. 11 e 12). Alterações semelhantes também foram observadas em *Astyanax jacuhiensis* expostos a efluentes petroquímicos (FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007), em *Heteropneustes fossilis* exposto a malation (DUTTA *et al.*, 1993) e em *Corydoras paleatus* exposto a parationa metílica (FANTA *et al.*, 2003).

Verificou-se congestão vascular dos sinusóides hepáticos nos peixes, a partir do grupo tratado com 5 mg L⁻¹, havendo aumento progressivo, chegando a 100%, no tratamento contendo 20 mg L⁻¹ de Zn na água (TAB. 6 - FIG. 9, 10, 11 e 12). A congestão vascular dos sinusóides ou em veias pequenas é uma mudança patológica que ocorre no fígado. Células hepáticas na área adjacente podem sofrer atrofia em casos severos de congestão (WESTER, *et al.*, 2002). Essa alteração é definida como o acúmulo de sangue causando dilatação dos vasos sanguíneos (ROBERTS, 1989). Este distúrbio circulatório está relacionado com a diminuição da velocidade de circulação de sangue no local. Em grandes proporções, causa diminuição das trocas metabólicas entre o plasma sanguíneo e o tecido, causando danos às células locais, conforme foi constatado em *Leporinus macrocephalus* expostos ao diquate (HENARES *et al.*, 2007); em peixes de água doce de áreas poluídas (GÜL *et al.*, 2004) e em *A. aff. bimaculatus* expostos ao Zn em diferentes concentrações agudas (SANTOS, 2009).

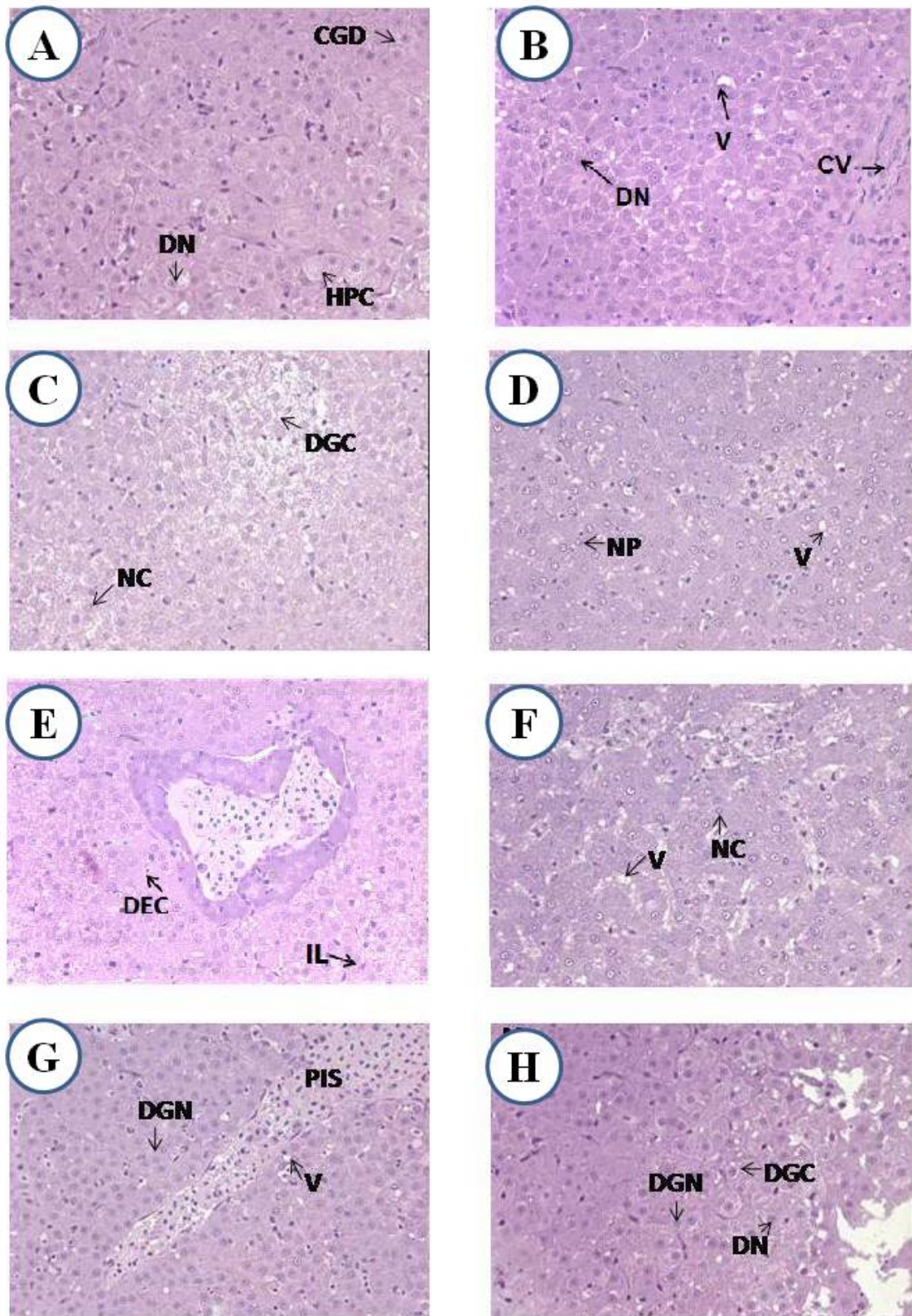


Figura 12: Fotomicrografias da organização estrutural do fígado de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 20 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (IL) infiltrado leucocitário; (NC) necrose; (DGN) degeneração nuclear; (DGC) degeneração citoplasmática; (V) vacuolização de hepatócito; (DEC) desarranjo da estrutura cordonal; (NP) núcleo picnótico; (DN) deslocamento do núcleo; (CV) congestão vascular; (PIS) proliferação e inchaço de sinusóide; (CGD) citoplasma com granulação densa; (HPC) hipertrofia celular. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B. Aumento: 280x.

Todos os grupos tratados com Zn apresentaram deslocamento de núcleo de hepatócito e hepatócitos com núcleo picnótico, que aumentaram gradativamente à medida que se aumentou a concentração de Zn na água (TAB. 6 – FIG. 9, 10, 11 e 12). A presença de grânulos no interior das células provoca o deslocamento do núcleo dos hepatócitos para a periferia das células (HENARES *et al.*, 2008). Já foi observado em tecidos hepáticos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas na represa de Guarapiranga- SP, a presença de hepatócitos com núcleos picnóticos progredindo para uma condição de cariólise, alteração esta possivelmente relacionada com a ação de substâncias tóxicas ou xenobióticas presentes na água da represa (SANTOS *et al.*, 2004).

O percentual da constituição tecidual dos núcleos de hepatócitos diminuiu significativamente nos grupos tratados com 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn em relação aos animais controle (TAB. 7 - FIG. 11 e 12). Diversos estudos demonstraram que as alterações no número, no tamanho e na forma do núcleo dos hepatócitos podem ser devido aos contaminantes (BRAUNBECK *et al.*, 1990).

Tabela 7: Percentual da constituição tecidual detectadas no fígado de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L⁻¹) na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

Constituição Tecidual (%)	Concentração de zinco em mg L ⁻¹				
	0	5	10	15	20
Núcleo de hepatócitos	11,55 ^a	10,00 ^{ac}	11,85 ^a	7,80 ^{bc}	9,10 ^{cb}
Citoplasma de hepatócitos	70,44 ^{ab}	62,00 ^b	64,41 ^{bc}	68,89 ^{ca}	73,00 ^{da}
Capilar sinusóide	17,41 ^a	27,00 ^b	22,25 ^{ab}	22,57 ^{ab}	17,20 ^a
Infiltrado leucocitário	0,61 ^{ac}	1,00 ^{ba}	1,50 ^{ac}	0,74 ^c	0,70 ^{ac}

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, p ≥ 0,05

Estatisticamente, houve diferença entre os diâmetros nucleares dos hepatócitos nos animais controle, tratados com 5 e 15 mg L⁻¹, em relação aos tratados com 20 mg L⁻¹ de Zn. No tratamento em que se utilizou a maior concentração de Zn, os animais apresentaram aumento no diâmetro nuclear dos hepatócitos (TAB. 8). As alterações no tamanho e na forma do núcleo têm sido frequentemente consideradas, tanto como sinais de aumento da atividade metabólica quanto de origem patológica (BRAUNBECK *et al.*, 1990). Já foi

constatada redução do diâmetro nuclear dos hepatócitos de *A. aff. bimaculatus* expostos a diferentes concentrações de Zn (SANTOS, 2009). A histopatologia hepática em peixes de água doce de áreas poluídas mostra extensa proliferação de hepatócitos, indicando aparentemente a ação tóxica de poluentes (GÜL *et al.*, 2004). A histologia qualitativa do fígado de tilápias expostas ao diquate mostrou o aumento no tamanho dos hepatócitos, que pode ser devido ao elevado índice de lipídios (HENARES *et al.*, 2008). Alterações no tamanho do núcleo foram observadas em *Brachydanio rerio* expostos a concentrações subletais de sulfato de cobre (PARIS-PALACIOS *et al.*, 2000)

Tabela 8: Diâmetro nuclear de hepatócitos e Índices hepatossomático de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) na água por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L^{-1} , 15 mg L^{-1} e 20 mg L^{-1} apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

	Concentrações de Zinco (mg L^{-1})				
	0	5	10	15	20
Diâmetro Nuclear de Hepatócitos (μm)	4,30 ^{ac}	4,38 ^{ac}	4,65 ^{cd}	4,34 ^a	5,20 ^d
IHS ₁	0,81 ^a	0,55 ^c	0,30 ^b	0,33 ^b	0,45 ^{bc}
IHS ₂	0,81 ^a	0,56 ^c	0,31 ^b	0,34 ^b	0,46 ^{bc}

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, $p \geq 0,05$

Houve redução significativa no percentual de citoplasma no grupo tratado com 5 mg L^{-1} de Zn em relação ao grupo controle (TAB. 7). Em estudo recente foi observado aumento progressivo no percentual de núcleos de hepatócitos, acompanhado da redução do percentual de citoplasma, indicando aumento da população celular hepática em todos os animais que entraram em contato com o Zn, quando comparados ao grupo controle (SANTOS, 2009).

Em relação aos índices hepatossomáticos (IHS₁ e IHS₂), houve redução significativa em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle (FIG. 13). O IHS₂ obteve resultados significativos indicando que o peso do fígado interfere nesse índice (TAB. 8). Alguns autores sugerem que a redução do IHS pode ocorrer devido à maior participação do fígado como fornecedor de energia (via glicogênio) para o processo de reabsorção e reorganização testicular do que na transferência de substâncias hepáticas para o metabolismo envolvido na produção de gametas nos testículos (ANDRADE *et al.*, 2006). Essa tendência é compartilhada por SAINT-PAUL (1984), que declara que os peixes apresentam 0,5 a 1,5% do peso em glicogênio hepático, e essa reserva é mobilizada,

principalmente, quando ocorre demanda súbita de energia. VARGAS e RIBEIRO (2009) relataram que os animais tratados com *Homeopatila RS*® apresentaram índice hepatossomático significativamente inferior ao grupo controle. As diferenças no metabolismo hepático, nos animais tratados, podem ser consideradas como fatores que poderiam alterar a proporção do fígado em relação ao peso corporal, uma vez que, neste experimento, os animais dos diferentes tratamentos apresentavam-se na mesma fase de desenvolvimento (VARGAS; RIBEIRO, 2009). Experimentos realizados em tilápias, não relacionados a intoxicações, apontam para diferenças nos índices hepatossomáticos, que podem estar correlacionadas à maior ou menor deposição lipídica ou de glicogênio neste órgão, dependendo da qualidade e quantidade da alimentação, bem como da fase de desenvolvimento dos peixes (BRUSLÉ; ANADON, 1996; LANNA *et al.*, 2004; CAVICHIOLO, 2005). Adicionalmente, a quantidade de poluentes no fígado de peixes é diretamente proporcional ao grau de poluição do ambiente por metais pesados e pesticidas, o que provoca um aumento no índice hepatossomático (FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007). Já foi constatado que o aumento do IHS obtido em *Perca fluviatilis* e *Scorpius myoxocephalus* pode ser indicativo do aumento da atividade de enzimas xenobióticas biotransformadas (HUUSKONEN; LINDSTRÖM-SEPPA, 1995; STEPHENSEN *et al.*, 2000) sendo sugerido existir também uma relação positiva entre o peso do fígado e o metabolismo de enzimas xenobióticas de tilápias expostas ao paraquate (FIGUEIREDO-FERNANDES *et al.*, 2006).

O fígado, como o maior órgão do metabolismo, entra em contato direto com poluentes absorvidos do ambiente (SALEH, 1982; BRAUNBECK *et al.*, 1990; GONZALEZ *et al.*, 1993), e lesões no fígado são frequentemente associadas com poluição do ambiente aquático. Os resultados obtidos demonstraram que a ocorrência de lesões no fígado parece estar relacionada à presença de Zn na água. Resultados semelhantes foram obtidos em outro estudo que observou existência de uma forte relação entre os contaminantes químicos encontrados nos sedimentos com aumento na prevalência de doenças de fígado (COLLIER *et al.*, 1998). A observação de lesões no fígado entre populações de teleósteos marinhos indica a potencialidade de utilização de peixes como modelos para o desenvolvimento de estudos toxicológicos (KRANZ; PETERS, 1985), com a degradação dos ambientes aquáticos.

A Resolução CONAMA n° 357 de 17 de março de 2005 estabelece o valor máximo de 5 mg L⁻¹ de Zn para água própria para a criação de animais (CONAMA, 2005). No entanto, de acordo com o presente estudo, a concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn na água

comprometeu as funções fisiológicas do fígado e das brânquias da espécie havendo, portanto, a necessidade de revisão desta legislação brasileira.

CONCLUSÃO

As alterações histológicas revelam que as crescentes contaminações causadas pelos níveis de Zn afetam o ambiente aquático, conduzem ao aparecimento de lesões irreversíveis tanto nas brânquias quanto no fígado de *A. aff. bimaculatus*, comprometendo a função destes tecidos e causando a morte dos peixes. Tal constatação indica que o Zn apresentou efeitos severos nas diferentes concentrações durante os testes de toxicidade subcrônica, e que esta espécie é adequada como bioindicador do ecossistema aquático.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P.D. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal of Fish Biology**, 9:441-446, 1976.

ANDRADE, D.R.; PEREIRA, M.C.; VIDAL JÚNIOR, M.V.; COSTA, A.P.R.; YASUI, G.S. Acompanhamento de um ciclo reprodutivo anual em machos de piau-vermelho (*Leporinus copelandii*, Pisces, Anostomidae) em ambiente natural. **Revista Ceres**, 53:41-49, 2006

AMORIM, P.K.; AYALA, C.O.; FÉLIX, F.C.; RINGOLIN de SÁ, O.; FENERICHVERANI, N.O. Fígado do bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) como biomarcador da contaminação do agrotóxico omite. In: **Anais do Encontro de Ecotoxicologia**, 2000, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, p.78, 2000.

ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis: UFSC, 2004, 231p.

ARELLANO, J.M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 44:62-72, 1999.

BENTLEY, P.J. Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 101:215-217, 1992.

BORDAJANDI, L.R.; GÓMEZ, G.; FERNÁNDEZ, M.A.; ABAD, E.; RIVERA, J.; GONZÁLEZ, M.J. Study on PCBs, PCDD/Fs, organochlorine pesticides, heavy metals and arsenic content in freshwater fish species from the River Turia (Spain). **Chemosphere**, 53:163-171, 2003.

BRAUNBECK, J.B.; STORCH, V.; BRESCH, H. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish (*Brachydanio rerio*) and trout (*Salmo gairdneri*) after prolonged exposure to 4-chloroamine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 19:405-418, 1990.

BRUSLÉ, J.; ANADON, C.G.I. The structure and function of fish liver. In: MUNSHI, J.S.D.; DUTTA, H.M. **Fish morphology, horizon of new research**. Enfield: Science Publisher Inc., 1996. p. 77-93.

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

CAJARAVILLE, M.P.; BENIANNI, J.M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, 247:295-311, 2000.

CAVICHIOLO, F. **Desempenho e morfologia de brânquias e fígado de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis e fontes de proteínas**. 2005. 57p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

CELIK, U.; OEHLENSCHLAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, 87:43-347, 2004.

CETESB. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: acessado em 6 de julho de 2009.

COLLIER, T.K.; JOHNSON, L.L.; STEHR, C.M.; MYERS, M.S.; STEIN, J.E. A comprehensive assessment of the impacts of contaminants on fish from an Urban Waterway. **Marine Environmental Research**, 46:243-247, 1998.

CONAMA - **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução CONAMA nº357 de 17/03/05, 2005.

DE BOECK G.; VLAEMINCK A.; BALM P.H.; LOCK R.A.; DE WACHTER B.; BLUST R. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interactions between Cu²⁺ and plasma cortisol elevation. **Environmental Toxicology Chemistry**, 20:374-381, 2001.

DUTTA, H.M.; ADHIKARI, S.; SINGH, N.K.; ROY, P.K.; MUNSHI, J.S.D. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 51:895-900, 1993.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 64:418-425, 2000.

EVANS, P.G.H. **The natural history of whales and dolphins**. New York: Facts On File, Inc. xiv, 1987, 343 pp.

FANTA, E.; RIOS, F.S.; ROMÃO, S.; VIANNA, A.C.C.; FREIBERGER, S. Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 54:119-130, 2003.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FERREIRA-CARDOSO, J.F.; GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; MATOS, P.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 27:103-109, 2007.

FIGUEIREDO-FERNANDES, A.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; PEIXOTO, F.; ROCHA, E.; REIS-HENRIQUES, M.A. Effect of paraquat on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus* at two levels of temperature. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 85:97-103, 2006.

FISHBASE. *Astyanax bimaculatus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4475&genusname=Astyanax&speciesname=bimaculatus>>. Acessado em: 20 de maio de 2009.

FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L.R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambari *Astyanax jacuhiensis* (COPE, 1984) (Teleostei, Characidae), sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**. Porto Alegre, 15:166-172, 2007.

FRACÁCIO, R.; VERANI, N.F.; ESPÍNDOLA, E.L.G.; ROCHA, O.; RIGOLIN-SÁ, O.; ANDRADE, C.A. Alterations on growth and gill morphology of *Danio rerio* (Pisces, Ciprinidae) exposed to the toxic sediments. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 6:685-695, 2003.

GARCIA-SANTOS, S.; MONTEIRO, S.M.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 59:376-381, 2007.

GONZALEZ, G.; CRESPO, S.; BRUSKE, J. Histo-cytological study of the liver of the cabrilla sea bass, *Serranus cabrilla* (Teleostei, Serranidae), an available model for marine fish experimental studies. **Journal of Fish Biology**, 43:363-373, 1993.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Science Publishers, Enfield, 2009. pp. 104-110

GÜL, 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**, 30:605-609, 2004.

- GUNDERSEN, D.T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S.D.; MILLAR, J.G.; BLAZER, V. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordane- contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 19:2275-2285, 2000.
- GRINWIS, G.C.M.; VAN DEN BRANDHOF, E.J.; DORMANS, J.; ENGELSMA, M.; KUIPER, R.; LEEWIS, R.; VAN LOVEREN, H.; WESTER, P.W.; VAAL, M.A.; VETHAAK, A.D.; VOS, J.G. Short term toxicity of bis (tri-n-butyltin) oxide in flounder (*Platichthys flesus*): pathology and immune function. **Bilthoven: National Institute of Public Health and Environmental Protection**, 732501:1-31, 1997.
- HAMILTON, D.P.; MALIK, D.S; SASTRY, K.V. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). **Environment International**, 24:433-438, 1998.
- HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G, WALLING, M.A. (Eds). **Handbook of toxicology pathology**. London: Academic Press, 2002, 1706p.
- HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1987. 384p.
- HENARES, M.N.P.; CRUZ, C.; GOMES, G.R.; PITELLI, R.A.; MACHADO, M.R.F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do diquat na brânquia e no fígado do piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 17:107-116, 2007
- HENARES, M.N.P.; CRUZ, C.; GOMES, G.R.; PITELLI, R.A.; MACHADO, M.R.F. Toxicidade aguda e efeitos histopatológicos do herbicida diquat na brânquia e no fígado da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, 30:77-82, 2008.
- 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.; KIMERLI, R.A.; MEHRLE, P.M.; BERGMAN, H.L. **Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, pp. 155 –196.
- HOLLIS, L.; PLAYLE, R.C. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. **Journal of Fish Biology**, 50:703-720, 1997.
- HUUSKONEN S.; LINDSTRÖM-SEPPA, P. Hepatic cytochrome P4501A and other biotransformation activities in perch (*Perca fluviatilis*): the effects of unbleached pulp mill effluents. **Aquatic Toxicology**, 31:27-41, 1995.
- JESUS, T.B.; CARVALHO, C.E.V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia Brasiliensis**, 12:680-693, 2008

JOHNSEN, K.; TANA, J.; LEHTINEN, K.J.; STUTHRIDGE, T.; MATTSSON, J.H.; CARLBERG, G. E. Experimental field exposure of brown trout to river water receiving effluent from an integrated newsprint mill. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 40:184-193, 1998.

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

KARLSSON-NORRGREN, L.; RUNN, P.; HAUX, C. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton- Buchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, 27:81-95, 1985.

KÖHLER, A., DEISEMANN, H.; LAURITZEN, B. Histological and cytochemical indices of toxic injury in the liver of dab *Limanda limanda*. **Marine Ecology Progress Series**, 91:141-153, 1992.

KRANZ, H.; PETERS, N. Pathological conditions in the liver of ruffe, *Gymnocephalus cernua* (L.) from the Elby estuary. **Journal of Fish Diseases**, 8:3-24, 1985.

LANNA, E.A.T.; PEZZATTO, L.E.; FURUYA, W.M. Fibra bruta e óleo em dietas práticas para alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, 33:2177-2185, 2004.

MALLATT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42:630-648, 1985.

McDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F.B. **Fish Ecophysiology**. London: Chapman & Hall, 1993, p.297-321.

McGEER, J.C.; SZEBEDINSZKY, C.; McDONALD, D.G.; WOOD, C.M. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs. **Aquatic Toxicology**, 50:231-243, 2000.

MONTEIRO, S.M. **Caracterização ultraestrutural do epitélio da brânquia de *O. niloticus*: Efeitos da exposição ao cobre**. 2001. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 2001.

MONTEIRO, S.M.; FONTAINHA-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Caracterização morfológica e ultraestrutural do epitélio branquial de peixes teleósteos. **Revista Portuguesa de Zootecnia**, 11:13-36, 2004.

MONTEIRO, S.M.; MANCERA, J.M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 141:375-383, 2005.

MOREIRA, A.B.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, 14:565-570, 2001

MYERS, M.S.; RHODES, L.D.; McCAIN, B.B. Pathologic anatomy and patterns of occurrence of hepatic neoplasms, putative preneoplastic lesions, and other iodopathic hepatic conditions in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. **Journal of the National Cancer Institute**, 78:333-363, 1987.

NEWSTEAD, J.D. Fine structure the respiratory lamellae of Teleostean gills. **Zeitschrift für Zellforschung**, 70:420-445, 1987.

NOGUEIRA, D.J.; CASTRO, S.C.; SÁ, O.R. Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas- MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803) como biomarcador de poluição ambiental. **Ciência e Praxis - Revista da Fundação de Ensino Superior de Passos**, 1:15, 2008.

NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. **Aquatic Toxicology**, 23:65-83, 1992

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211p

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.

PANDEY, S.; PARVEZ, S.; ANSARI, R. A.; ALI, M.; KAUR, M.; HAYAT, F.; AHMAD, F.; RAISUDDIN, S. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Chemico-Biological Interactions**, 174:183-192, 2008.

PARIS-PALÁCIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra) structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. **Aquatic Toxicology**, 50:109-124, 2000.

PLAYLE, R.C.; GENSEMER, R.W.; DIXON, D.G. Copper accumulation on gills of fathead minnows: influence of water hardness, complexation and pH of the gill micro-environment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 11:381-391, 1992.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, 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, 1994, pp.339-352.

POURAHAMAD, J.; O'BRIEN, P.J. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu^{2+} , and Cd^{2+} . **Toxicology**, 143:263-273, 2000.

RABITTO, I.S.; COSTA, J.R.M.A.; 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 TBT (tributyltin) on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 60:147-156, 2005.

RASHED, M.N. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, 7:27-33, 2001.

RIBELLES, A.; CARRASCO, M.C.; ROSETY, M.; ALDANA, M. Morphology and histochemical changes in the liver and pancreas of gilthead, *Sparus auratus* L., induced by acute action of the anionic detergent, sodium dodecyl sulphate. **Histology and Histopathology**, 10:781-787, 1995.

ROBERTS, R.J. The pathophysiology and systematic pathology of teleosts. In: ROBERTS, R.J. (Ed.) **Fish pathology**. 2nd ed. London: Baillière Tindall, 1989. pp. 56-134.

SAKURAGUI, M.M. **Respostas respiratórias e adaptações fisiológicas de traíra, *Hoplias malabaricus* (Telostei, Erythrinidae) submetidos à hipóxia durante exposição à água deionizada**. 2000. 88p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, 2000.

SALEH, H. H. Fish liver as indicator of aquatic environmental pollution. **Bulletin of the Institute of Oceanography and Fisheries**, 8:69-79, 1982.

SANTOS, A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T; FELIZARDO, N.N.; RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de fígado de Tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**. São Paulo, 30:141-145, 2004

SANTOS, D.C.M. **Toxidez aguda do zinco em lambari *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. 2009. 115p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SAINT-PAUL, U. Investigations on the seasonal changes in the chemical composition of the liver and conditional from a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum* (Serrasalminae). **Amazoniana**, 9:147-158, 1984.

SCHWAIGER, J. Histopathological alterations and parasite infection in fish: indicators of multiple stress factors. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, 8:231-240, 2001.

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.

STENTIFORD, G.D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B.P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S.W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, 55:137-159, 2003.

- STEPHENSEN E.; SVAVARSSON, J.; STURVE, J.; ERICSON, G.; ADOLFSON-ERICI, M.; FÖRLIN, L. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the south-west coast of Iceland. **Aquatic Toxicology**, 48:431-442, 2000.
- STEGEMAN, J.J.; LECH, J.J. Cytochrom p-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. **Environmental Health Perspectives**, 90:93-100, 1991.
- TEH, S.J.; ADAMS, S.M.; HINTON, D.E. Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, 37:51-70, 1997.
- TEMMINK, J.; BOUWMEISTER, P.; DE JONG, P. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicology**, 4:165-179, 1983
- THOMAS, P. Molecular and biochemical responses of fish to stressors and their potential use in environmental monitoring. **American Fisheries Society Symposium**, 8:9-28, 1990.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E.S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARITKHUAN, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, 121:307-320, 2003.
- VARANKA Z.; ROJIK I.; VARANKA I.; NEMCSÓK J.; ÁBRAHÁM, M. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio* L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 128:467-478, 2001.
- VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P. Homeopatia populacional em tilápias do Nilo *Oreochromis niloticus*. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Tavares-Dias, M. (Organizador). Embrapa Amapá, Macapá, 2009. pp.106-131.
- VISOOTTIVISETH P.; THAMAMARUITKUN T.; SAHAPHONG S.; RIENGROJPITAK, S.; KRUATRACHUE, M. Histopathological effects of triphenyltin hydroxide on liver, kidney and gill of Nile tilapia (*Oreochromis nilotica*). **Applied Organometallic Chemistry**, 13:49-763, 1999.
- WATANABE, T.; KIRON, V.; SATOH, S. Trace minerals in fish nutrition. **Aquaculture**, 151:185-207, 1997.
- WESTER, P.W.; VAN DER VEN, L.T.M.; VETHAAK, A.D.; GRINWIS, G.C.M.; VOS, J.G. Aquatic toxicology: opportunities for enhancement through histopathology. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 11:289-295, 2002.

CAPITULO 3

MORFOLOGIA TESTICULAR DE *Astyanax aff. bimaculatus* EXPOSTOS AO ZINCO

RESUMO

Processos naturais e atividades antropogênicas liberam para o ambiente aquático uma grande variedade de produtos tóxicos, dentre eles metais como o zinco (Zn), capazes de interagir com o organismo vivo causando múltiplas alterações, as quais podem gerar graves consequências em organismos. Neste contexto, este trabalho propôs-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de Zn na histologia dos testículos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*) adultos, após exposição subcrônica, e avaliar o potencial da espécie como bioindicador de ambientes impactados. Foram utilizados 65 lambaris, divididos igualmente em 5 aquários. Foi instituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. A cada dia acrescentou-se 0,16, 0,33, 0,5 e 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Zn na água, totalizando 5, 10, 15 e 20 mg L^{-1} de Zn, respectivamente, no final do período experimental, de 30 dias. Ao final da exposição, os animais foram anestesiados, eutanasiados, medidos, pesados sendo retirados os ossos, testículos, fígado, brânquias, cabeça e músculo. Fragmentos de testículos foram fixados, incluídos e seccionados em micrótomo rotativo e corados para confecção de preparações histológicas. Foram qualificadas e quantificadas várias histopatologias nos testículos onde também foram quantificados pontos coincidentes sobre cisto, intertúbulo, espermatozoides, líquido seminal. Também foram calculados os índices gonadossomáticos. A presença de alterações histológicas para cada organismo foi avaliada de forma semi-quantitativa através do método *Degree of Tissue Change* (DTC), expressando a gravidade das lesões. Todos os grupos tratados obtiveram valores do DTC superiores a 100, com média 403 ± 24 indicando a presença de alterações irreversíveis nos testículos. As maiores dosagens de Zn obtiveram os maiores valores de DTC. Em relação ao índice gonadossomático, houve aumento significativo em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle. A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao Zn provocou alterações histopatológicas severas e permanentes nos testículos, levando à redução na produção de espermatozoides, o que pode comprometer a taxa de fecundidade e provocar a extinção local das populações. Tal constatação indica que o Zn apresentou efeitos severos nas diferentes concentrações durante os testes de toxicidade subcrônica, afetando negativamente a reprodução dos peixes e que esta espécie é adequada como bioindicador do ecossistema aquático.

PALAVRAS-CHAVE: Espermatogênese, histopatologias, peixes, toxidez.

ABSTRACT

Natural processes and human activities release into the aquatic environment a wide variety of toxic products, among them metals such as zinc (Zn), able to interact with the living organism causing multiple changes, which can have severe effects on organisms. In this context, this study proposed to study the effects of different concentrations of Zn in the histology of the testes of minnows (*A. aff. bimaculatus*) adults after subchronic exposure, and evaluate the potential of the species as a bioindicator of similar environments. Sixty five lambaris were used, divided equally into five tanks. A control group was made, kept under the same conditions as the treated ones, nevertheless without the metal. Every day was added 0,16, 0,33, 0,5 and 0,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ of Zn in the water, adding up to 5, 10, 15 and 20 mg L^{-1} Zn, respectively, at the end of the experimental period, of 30 days. At the end of exposure, animals were anesthetized, euthanized, weighed, measured and the bones, testis, liver, gills, head and muscle were removed. Collected tissue samples of testis were fixed, included and sectioned with a rotary microtome and stained for making histological preparations. Were qualified and quantified several histopathology in the testis which were also measured matching points on cyst, intertubular, sperm, seminal fluid. We also calculated the gonadosomatic indices. The presence of histological changes for each organism was assessed in a semi-quantitative method through the Degree of Tissue Change (DTC), expressing the severity of injuries. All treated groups achieved values of DTC than 100, averaging 403 ± 24 indicating the presence of irreversible changes in the testes. The higher doses of Zn had the highest values of DTC. In relation to gonadosomatic index increased significantly in all treated groups compared to the control group. Exposure of *A. aff. bimaculatus* to Zn caused severe histopathological changes and permanent in the testis, leading to a reduction in sperm production, which may compromise the fertility rate and cause the extinction of local populations. This indicates that Zn had severe effects at different concentrations for the subchronic toxicity tests, adversely affecting fish reproduction and that this species is suitable as bioindicators of the aquatic ecosystem.

KEY WORDS: Spermatogenesis, histopathology, fish toxicity.

INTRODUÇÃO

A preocupação com a biodiversidade no Brasil tem crescido acentuadamente nas últimas duas décadas, acompanhada pela proliferação de organizações conservacionistas não governamentais e pela legislação ambiental. Além disso, agências governamentais relevantes consolidaram-se e expandiram-se, levando à criação do Ministério do Meio Ambiente. Várias áreas protegidas foram criadas desde o início dos anos 1980 e a mídia tem dado atenção crescente à conservação da vida silvestre (AGOSTINHO *et al.*, 2005). Segundo estes autores, as principais causas da perda direta da biodiversidade em ecossistemas aquáticos continentais brasileiros são poluição e eutrofização, assoreamento, construção de barragens e controle de cheias, pesca indiscriminada e introdução de espécies.

Na água, os metais e os resíduos de pesticidas podem ser adsorvidos pelo material em suspensão, depositados no sedimento ou absorvidos por organismos, podendo ser metabolizados, desintoxicados e/ou acumulados (AGUIAR, 2002).

Respostas biológicas ao estresse provocado pelos poluentes podem ser utilizadas para identificar sinais iniciais de danos aos peixes e podem ser denominadas biomarcadores. Estes biomarcadores são excelentes ferramentas para monitorar a saúde do ecossistema aquático e têm sido incluídos em vários programas modernos de monitoramento ambiental de países desenvolvidos (WALKER *et al.*, 1996).

Os peixes habitam uma enorme variedade de ambientes aquáticos. Além disso, seus hábitos de acasalamento são freqüentemente influenciados por fatores ambientais como temperatura e salinidade (MIURA, 1999). Os efeitos de contaminantes em peixes podem se manifestar em vários níveis de organização biológica, incluindo disfunções fisiológicas, alterações estruturais em órgãos e tecidos, e modificações comportamentais prejudicam o crescimento e reprodução (ADAMS, 1990).

Os testículos dos peixes estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestório, ventralmente ao mesonefro e ventrodorsalmente ao longo da bexiga gasosa, encontrando-se presos à parede celomática e à bexiga gasosa pelo mesórquio. Macroscopicamente os testículos da maioria dos teleósteos estudados são órgãos pares, podendo estar parcial ou totalmente fundidos entre si, apresentam usualmente tamanho similar entre o direito e o esquerdo e são freqüentemente alongados, embora existam outras formas como lobulados e foliáceos (LE GAC; LOIR, 1999).

Os testículos consistem essencialmente de dois compartimentos. Um deles, chamado compartimento seminífero, é composto de células germinativas e elementos não germinativos, as células somáticas de Sertoli, formando estruturas denominadas lóbulos ou túbulos seminíferos. O segundo compartimento é do tecido intersticial que, além dos elementos do tecido conjuntivo, veias e vasos linfáticos, possui células de Leydig que produzem hormônios andrógenos. Estes compartimentos estão envolvidos por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular (PUDNEY, 1995; FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2004).

A produção de andrógenos é importante para a diferenciação sexual, para o desenvolvimento das características sexuais secundárias, para o comportamento sexual e para a regulação da espermatogênese (WELTZIEN *et al.*, 2004). O compartimento tubular contém células somáticas (células de Sertoli) e células germinativas, que irão formar os espermatozóides após passarem por um processo bastante complexo e altamente organizado – a espermatogênese (BILLARD, 1990; KOULISH *et al.*, 2002).

A espermatogênese é um processo de desenvolvimento complexo. Ela começa com a proliferação mitótica da espermatogônia e, na sequência, passa por duas divisões de redução meiótica e termina com a espermiogênese, durante a qual a espermátide haplóide se diferencia em espermatozóide. Embora seja geralmente aceito que os principais hormônios controladores da espermatogênese de vertebrados sejam as gonadotrofinas hipofisárias (GTHs) e andrógenos, o papel específico desempenhado por hormônios, individualmente, não foi ainda bem estabelecido. Progressos nesse campo são dificultados pela complexa organização dos testículos de vertebrados superiores, nos quais os túbulos seminíferos contêm várias e sucessivas gerações de células germinativas. Por outro lado, as células germinativas dentro de cada cisto testicular formado pelas células de Sertoli nos peixes desenvolvem-se sincronicamente. Este sistema tem provado ser vantajoso para o estudo da espermatogênese (MIURA, 1999).

O desenvolvimento do aparelho reprodutivo é um processo contínuo durante a ontogenia e, conseqüentemente, está sujeito ao efeito de estressores ambientais em todas as fases do ciclo de vida (HOAR; RANDALL, 1969). Poluentes como metais pesados, derivados do petróleo, esgotos domésticos ou industriais e agrotóxicos, chegam ao ecossistema prejudicando os organismos vivos, nos quais as moléculas dos tóxicos geram distúrbios nas células, promovendo alterações de membrana que refletem no ciclo celular, nas suas diferentes etapas (NAZ, 1999).

A exposição a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida tem como características gerais, relacionadas com o aparelho reprodutor, o retardamento de fases de

desenvolvimento e da maturação gonadal, a redução no número e viabilidade de gametas, histopatologias de testículo e ovário e a redução do número e viabilidade de descendentes (RAND; PETROCELLI, 1985; ADAMS, 1990). Alguns estudos realizados com adição de metais pesados (cádmio, cobre, arsênico e mercúrio) na água demonstraram inibição da espermatogênese em peixes, apresentando grande quantidade de espermatogônias e espermatócitos, pequena quantidade de espermátides maduras, atrofia ou necrose das células intersticiais e mudanças na estrutura das células de Sertoli (AHSAN; AHSAN, 1974; SEHGAL; PANDEY, 1984; SEHGAL *et al.*, 1984; SHUKLA; PANDEY, 1984c; RAM; SATHYANESAN, 1986; SRIVASTAVA, 1987; PUNDIR; SAXENA, 1990).

O desenvolvimento gonadal foi reduzido quando *Cyprinus carpio* foram expostos a situações de hipóxia por oito semanas. Houve redução significativa no número dos espermatócitos e das espermátides, reduziu-se a ocorrência de mitoses, diminuindo o diâmetro lobular dos testículos, além da motilidade espermática dos animais (CHELLAPPA *et al.*, 2004)

Em estudos realizados sobre toxicidade do Zn em peixes, *Lebistes reticulatus*, em que os animais, machos e fêmeas, foram expostos a concentração subletal do Zn, constatou-se a inibição da resposta gonadal dos peixes, tanto nas fêmeas quanto nos machos e alteração na histologia e nas funções normais dos órgãos reprodutivos (SEHGAL *et al.*, 1984; SEHGAL; SAXENA, 1986).

Neste contexto, este trabalho propôs-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de Zn na histologia dos testículos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*) adultos, após exposição subcrônica, e avaliar a espécie como bioindicador de ecossistemas aquáticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (UnB), protocolo nº 95806/2009. Foram utilizados 65 machos de *A. aff. bimaculatus*, procedentes da Piscicultura da Universidade Federal de Viçosa, localizada na cidade de Viçosa-MG.

A pesquisa foi desenvolvida nos seguintes Laboratórios: Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária; Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral; Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal; Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Solos, todos da Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados cinco aquários de vidro, cada um com capacidade de 150 L de água livre de cloro (por evaporação), mantendo-se 13 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtração por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 l/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos aquários era sifonado para eliminar restos de matéria orgânica e, imediatamente, substituído, mantendo-se as mesmas características iniciais. A qualidade da água foi monitorada a cada sete dias, medindo-se: o oxigênio dissolvido, a amônia tóxica, a dureza total e o nitrito através de *kits* colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH, pelo medidor de pH digital de bancada (Tracom 10) e a condutividade elétrica, pelo condutivímetro digital de bancada (Tonka CD 820). Foram coletadas amostras de água a cada sete dias para determinação das concentrações de Zn através do espectrofotômetro de absorção atômica (SpectrAA 220FS Varian).

A temperatura foi controlada (26 ± 1 °C) (FISHBASE, 2009) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W). O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro, controlado por temporizador. Os peixes tiveram alimentação diária *ad libitum* ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida 2 vezes ao dia, as 8 e às 17 horas. Essa ração apresenta-se em grânulos de 4 mm e, devido à incompatibilidade com o tamanho da cavidade bucal dos peixes, foi triturada e peneirada, utilizando-se peneira com malha de 1 mm.

Os animais foram expostos a concentrações de 5, 10, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn na água, que foram divididas durante o período experimental, de 30 dias. A cada dia acrescentou-se 0,16; 0,33; 0,5 e 0,66 µg L⁻¹ de Zn, fornecido na forma de ZnSO₄.7H₂O (Merck, n° 1.08883.1000). Foi constituído um grupo controle, mantido nas mesmas condições que os tratados, porém sem o metal. Cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 13 repetições.

A partir do momento que foi observado mortalidade dos animais, no 15° dia experimental, foram feitas observações a cada hora para retirada dos animais mortos nesse intervalo. Estes animais foram submetidos aos mesmos procedimentos daqueles que sobreviveram até o final do tempo de exposição. Ao final do período experimental, os animais foram previamente anestesiados com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia, sendo então eutanasiados por secção da medula espinhal, ao nível do opérculo.

De cada exemplar foram registrados os seguintes dados: comprimento total (CT), comprimento padrão (CP), peso corporal (PC), peso das gônadas (PG), peso do fígado (PF),

peso das brânquias (PB), peso dos fragmentos de músculos (PM), peso da cabeça (PCa) e peso dos fragmentos dos ossos (PO). Os pesos foram obtidos utilizando-se uma balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Scientech, AS 210). Para a medição, utilizou-se paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de 0,02 mm e, para a retirada dos tecidos, tesoura e bisturi cirúrgico. Para a histologia das brânquias, foram utilizados fragmentos da região mediana do segundo arco braquial, e para a histologia do fígado e dos testículos, as regiões medianas dos respectivos órgãos.

Foram retirados fragmentos de músculo, testículo, fígado, osso e brânquias para a determinação da concentração de Zn nestes tecidos através de espectrofotometria de absorção atômica.

Fragmentos testiculares foram fixados em solução de Karnovsky por 24 horas e depois transferidos para álcool 70%. Em seguida, foram desidratados em série etanólica crescente, com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica).

Após a inclusão foram feitas secções seriadas de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1%, montadas com Entellan®-Merck, e analisadas sob microscopia de luz (Olympus BX-50). As imagens digitais foram obtidas utilizando fotomicroscópio Olympus AX70 TRF.

Para as análises histológicas do testículo foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias, utilizando-se dez campos/animal: ruptura de cisto, deslocamento da parede dos túbulos, retardo do desenvolvimento gonadal, agrupamento celular, núcleo picnótico, vacuolização, muco, degeneração, descolamento de cisto, destruição do tecido intertubular, desorganização dos cistos e destruição dos cistos.

Morfometricamente foram quantificados pontos coincidentes sobre cisto, intertúbulo, espermatozóides e líquido seminal, através do programa para análise de imagem Image Pro Plus, totalizando 2660 pontos por animal, sendo os resultados expressos em percentagem.

Para obter a relação entre o peso corporal e o peso das gônadas foi calculado o índice gonadossomático (IGS) mediante a fórmula: $IGS_1 = PG/PC \times 100$. E para estimar a influência do peso dos testículos sobre o IGS foi utilizada a fórmula: $IGS_2 = PG / (PC - PG) \times 100$, em que PG = Peso das gônadas e PC = Peso Corporal.

A presença de alterações histológicas para cada organismo foi avaliada de forma semi-quantitativa através do *Degree of Tissue Change* (DTC), o qual foi baseado na gravidade das lesões. Para o cálculo do DTC, segundo POLËKSIC; MITROVIC-TUTUNDZIC (1994), as

alterações foram classificadas em estágios (ou fases) progressivos para cada tecido, que variam de I a III. Alterações do estágio I são consideradas leves, não alteram a função do tecido; alterações do estágio II são moderadas e alteram parcialmente a função do tecido; e alterações do estágio III são severas, alteram totalmente a função do tecido. O valor do DTC foi calculado para cada animal utilizando-se a seguinte fórmula $DTC = (1 \times SI) + (10 \times SII) + (100 \times SIII)$, onde I, II e III correspondem ao número de alterações dos estágios I, II e III, respectivamente. Os valores do DTC entre 0 a 10 indicam funcionamento normal do órgão; valores entre 11 e 20 indicam leves alterações; valores entre 21 e 50 indicam alterações moderadas no órgão; valores entre 51 e 100 indicam lesões severas no órgão e valores acima de 100 indicam alterações irreversíveis.

Os resultados dos constituintes do tecido testicular e índice gonadosomático foram submetidos à análise estatística utilizando-se teste de Newman-Keuls com $p \geq 0,05$. Os resultados de histopatologias foram analisados de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O comprimento padrão e os pesos do fígado, dos testículos e da cabeça variaram significativamente entre os grupos tratados e o grupo controle (TAB. 1). No entanto não foram observadas diferenças significativas no peso e altura corporal e peso das brânquias.

A qualidade da água avaliada durante o período experimental não diferiu significativamente ao longo do período nem entre os diferentes tratamentos, exceto com relação à condutividade elétrica, que aumentou à medida que a concentração de Zn na água aumentava (TAB. 1 - ANEXO A). Os resultados de pH, oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito encontravam-se dentro da faixa determinada como adequada para peixes de água doce (OSTRENSKY; BOEGER, 1998; MOREIRA *et al.*, 2001; ARANA, 2004). A condutividade elétrica acima de $100 \mu S \text{ cm}^{-1}$ está associada, em geral, a ambientes impactados fornecendo assim uma boa indicação das modificações na composição de uma água, especialmente na sua concentração mineral, mas não fornece qualquer indicação das quantidades relativas dos vários componentes. À medida que mais sólidos dissolvidos são adicionados, a condutividade da água aumenta e altos valores podem indicar características corrosivas da água (CETESB, 2009).

A concentração de Zn dos aquários foi monitorada a cada sete dias. Constatou-se que as concentrações deste elemento sofreram aumento gradativo durante os 30 dias de exposição. A adição diária de Zn, embora tenha ocasionado aumento na concentração do mesmo em

solução, não atingiu os valores definidos nos tratamentos. Provavelmente, processos adsorptivos nas paredes dos recipientes ou com material em suspensão tenham colaborado para que as concentrações definidas nos tratamentos não tenham sido alcançadas.

Tabela 1: Biometria corporal de machos de *A. aff. bimaculatus* (um grupo controle e quatro tratamentos) em condições de exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias.

Padrões	Concentração de Zinco (mg L ⁻¹)				
	0	5	10	15	20
PC (g)	5,437 ^a	6,811 ^a	10,311 ^a	7,085 ^a	6,536 ^a
CP (cm)	4,710 ^a	6,336 ^b	6,764 ^b	6,747 ^c	6,822 ^b
AC (cm)	2,280 ^a	2,063 ^a	2,194 ^a	2,152 ^a	2,311 ^a
PF (g)	0,044 ^a	0,039 ^{ab}	0,021 ^b	0,023 ^b	0,028 ^{ab}
PT (g)	0,053 ^a	0,157 ^b	0,180 ^b	0,197 ^b	0,204 ^b
PB (g)	0,184 ^a	0,183 ^a	0,209 ^a	0,223 ^a	0,208 ^a
PCa (g)	0,839 ^a	1,109 ^b	1,005 ^{ab}	1,055 ^b	0,993 ^b

Legenda: PC: peso corporal; CP: comprimento padrão; AC: altura corporal; PF: peso do fígado; PT: peso dos testículos; PB: peso das brânquias e PCa: peso da cabeça.

*Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, $p \geq 0,05$

No grupo controle e no grupo tratado com concentração de 5 mg L⁻¹ de Zn não houve mortalidade dos peixes até o final do experimento. Entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

A morte dos peixes foi precedida de comportamento anormal, permanecendo próximos à superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia. Aqueles que sobreviveram reduziram a ingestão de alimento. Por outro lado, os animais que não receberam o Zn e aqueles que receberam o metal na concentração de 5 mg L⁻¹, movimentavam-se intensamente em cardumes e se alimentavam normalmente, mostrando comportamento semelhante ao grupo de controle.

Tabela. 2: Percentual da mortalidade de *A. aff. bimaculatus* durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L^{-1}) ($n = 13$)

Concentração de zinco (mg L^{-1})	Mortalidade (%)					Total
	Tempo (dias)					
	14	20	25	28	30	
0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
10	0	24	18	20	0	62
15	0	23	27	35	0	85
20	0	26	32	42	0	100

Trabalho realizado por SANTOS (2009) utilizando-se *A. aff. bimaculatus* sob exposição aguda (96 h), verificou-se que não houve mortalidade em concentração de 5 mg L^{-1} de Zn, enquanto que na concentração de 20 mg L^{-1} ocorreu 100% de mortalidade em apenas 24 horas. A concentração letal para 50% dos organismos (CL50) na exposição aguda (96 horas), para *A. aff. bimaculatus*, foi determinada como sendo de 10 mg L^{-1} de Zn, o dobro do permitido pela legislação brasileira (5 mg L^{-1}) na água para criação de animais (CONAMA, 2005), indicando o alto nível de toxicidade do Zn para a espécie em estudo.

Os testículos de *A. aff. bimaculatus* do grupo controle apresentaram características similares às de outros teleósteos, mostrando uma organização tubular seminífera cística (RUSSELL *et al.*, 1990). A espermatogênese desenvolve-se em cistos que se formam quando células de Sertoli e uma espermatogônia primária se associam (MATTA, 2000). Durante o processo espermatogênico todas as células germinativas dentro de um cisto estão na mesma fase de desenvolvimento (PUDNEY, 1995) (FIG. 1).

Foram encontradas as seguintes alterações nos testículos: ruptura de cisto, deslocamento da parede dos túbulos, retardo do desenvolvimento gonadal, agrupamento celular, núcleo picnótico, vacuolização, muco, degeneração, deslocamento de cisto, destruição do tecido intertubular, desorganização dos cistos, destruição dos cistos (TAB. 3). Segundo diversos autores, inibição da espermatogênese, grandes números de espermatogônias e espermatócitos, pouco esperma, espermatídes maduras, atrofia e/ou necrose das células intersticiais e mudanças na estrutura das células de Sertoli são efeitos comuns observados em

peixes expostos a metais pesados (SEHGAL; PANDEY, 1984; SEHGAL *et al.*, 1984; SHUKLA; PANDEY, 1984b; RAM; SATHYANESAN, 1986; SRIVASTAVA, 1987; PUNDIR; SAXENA, 1990; CREASY, 1997). Foram também observadas outras mudanças estruturais no sistema reprodutivo de machos causados por metais pesados como má formação, danos ao ducto espermático, paredes dos túbulos danificadas e coagulação sanguínea lobular (SEHGAL; PANDEY, 1984; SEHGAL *et al.*, 1984; SHUKLA; PANDEY, 1984c; SRIVASTAVA, 1987; PUNDIR; SAXENA, 1990).

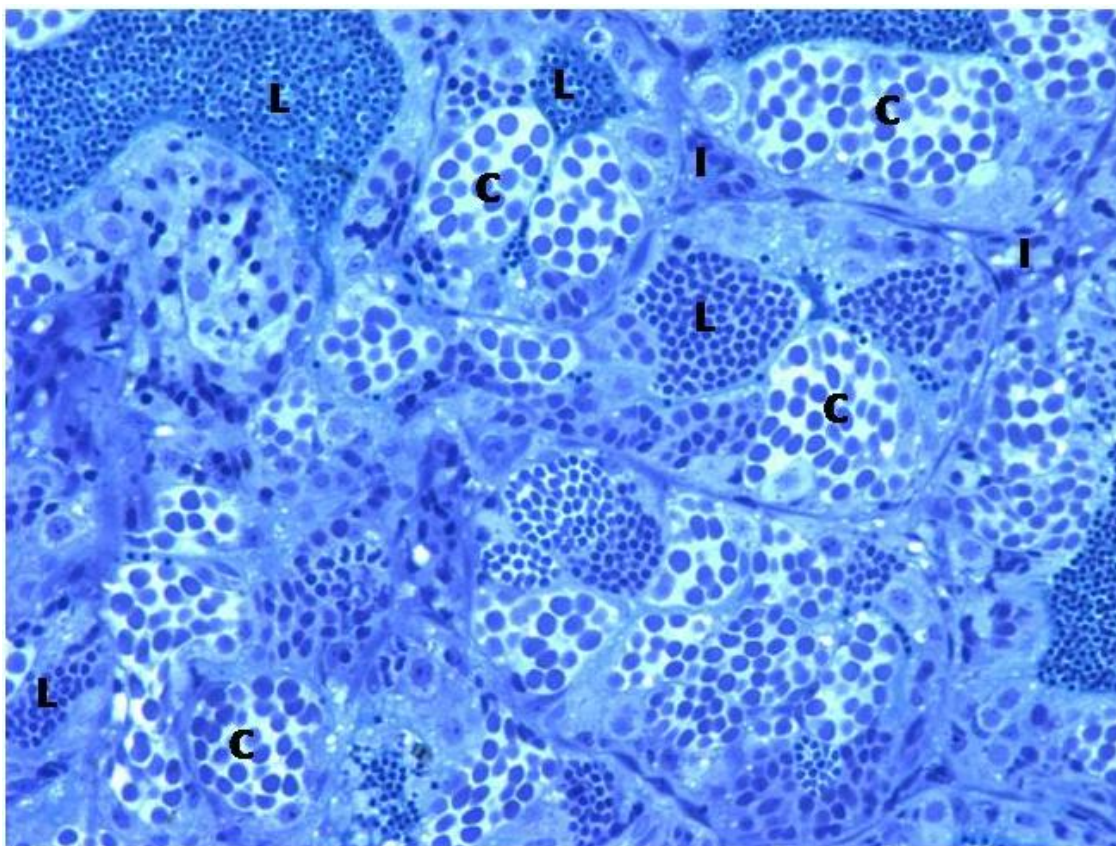


Figura 1: Fotomicrografias da organização estrutural testicular de *A. aff. bimaculatus* do grupo controle. (C) cistos, (L) lúmen tubular contendo espermatozoides e fluido testicular, (I) Intertúbulo. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 450x.

A histopatologia testicular é considerada o parâmetro mais indicado para a detecção da toxicologia testicular (TAKAYAMA *et al.*, 1995).

Todos os grupos tratados obtiveram valores do *Degree of Tissue Change* (DTC) superiores a 100, com média $403 \pm 24,04$, indicando a presença de alterações irreversíveis nos testículos. As maiores dosagens de Zn obtiveram os maiores valores de DTC (FIG.2 - TAB. 3).

Observou-se em todos os grupos tratados número crescente de células contendo vacuolizações, podendo tornar-se células necróticas quando encontradas em estágio avançado.

No grupo tratado com 10 mg L⁻¹ de Zn, 90% dos peixes apresentavam esta patologia. E no grupo contendo 20 mg L⁻¹, ela foi encontrada em 98% dos animais (TAB. 4 - FIG. 3, 4, 5 e 6). Foram observadas em indivíduos machos de *Lebistes reticulatus*, tratados com concentração subletal (300 rag L) de sulfato de zinco por 20 dias, mudanças drásticas nos testículos, entre as quais vacuolização nos espermatozóitos (SEHGAL; SAXENA, 1986).

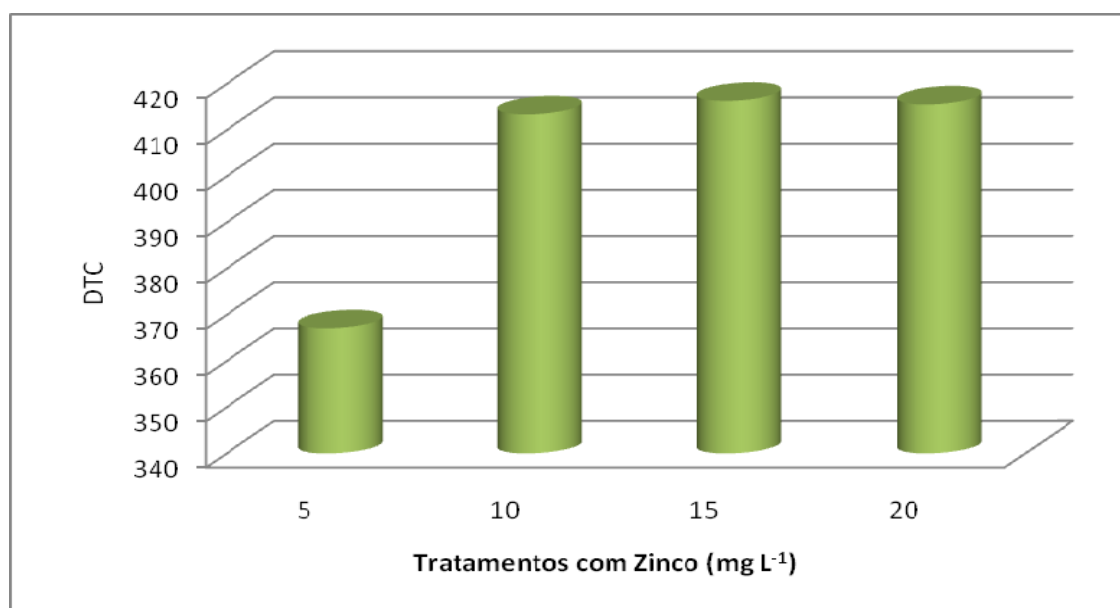


Figura 2: Valores médios do *Degree of Tissue Change* (DTC) nos testículos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias. Sendo que entre o 15° e o 28° dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg.L⁻¹, 15 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

Tabela 3: Divisão em estágios (modificado por CONDESSA, 2009) e percentual da média geral das alterações histopatológicas dos testículos detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água por 30 dias. Sendo que entre o 15° e o 28° dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

ESTÁGIOS	HISTOPATOLOGIAS	MÉDIA GERAL (%)
I	Ruptura de Cisto	77,49
	Deslocamento da parede dos Túbulos	19,05
	Retardo do desenvolvimento Gonadal	28,45
	Agrupamento Celular	56,01
II	Núcleo Picnótico	46,49
	Vacuolização	88,96
	Muco	3,33
	Degeneração	68,58
	Descolamento de Cisto	3,30

III	Destruição do Tecido Intertubular	56,68
	Desorganização dos Cistos	34,40
	Destruição dos Cistos	31,26

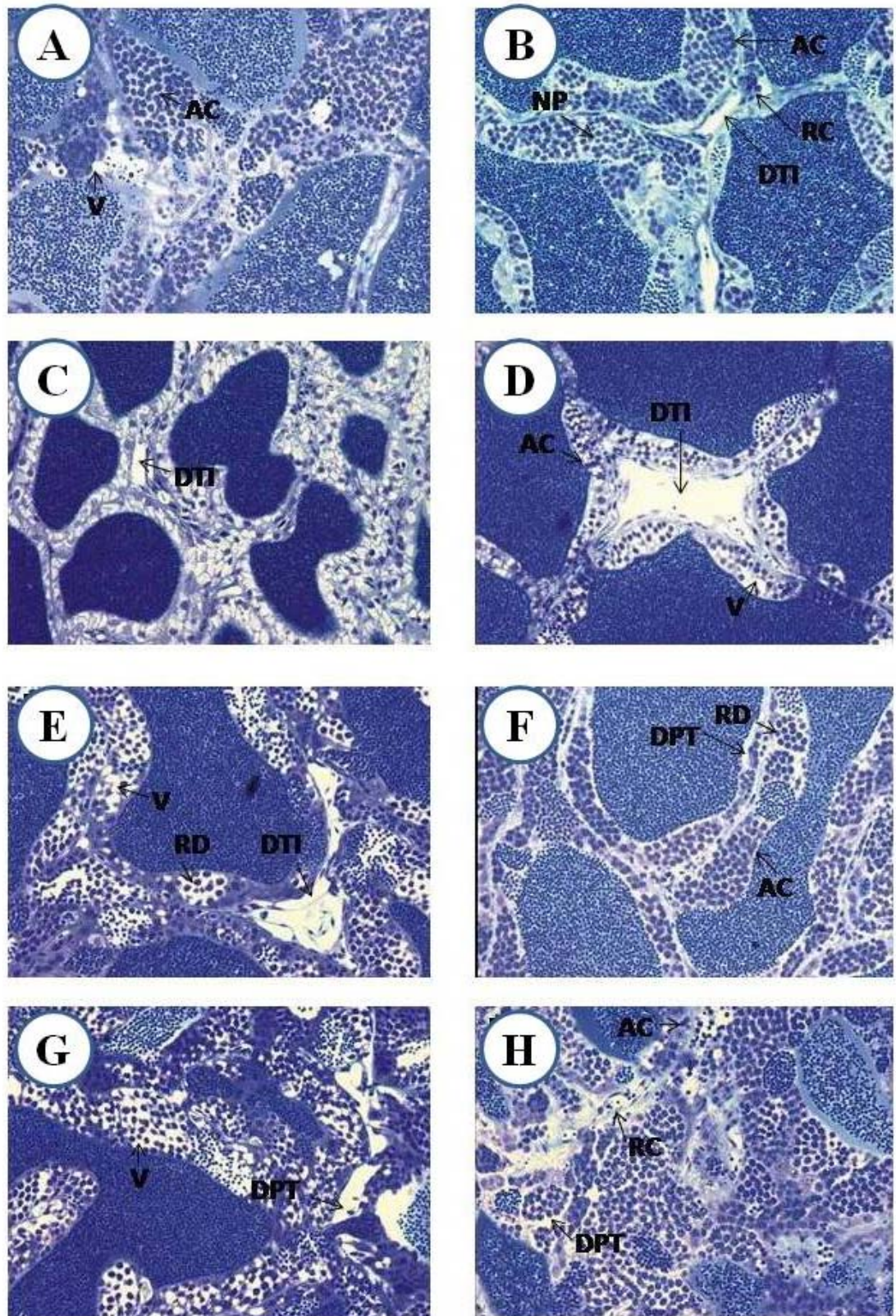


Figura 3: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de *A. aff. bimaculatus*, expostos a concentração de 5 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (AC) aglomeração celular;

(V) vacuolização; (DPT) deslocamento da parede dos túbulos; (RC) ruptura de cisto; (DTI) destruição do tecido intertubular; (RD) retardo no desenvolvimento do cisto; (NP) núcleo picnótico. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

À medida que se aumentou a concentração de Zn na água, aumentou também o percentual de ruptura de cistos. Em 50% dos animais tratados com 5 mg L⁻¹ de Zn houve ruptura de cisto e no grupo com 20 mg L⁻¹, este percentual chegou a 94% (TAB. 4 - FIG. 3, 4, 5 e 6). Estudo realizado com *A. aff. bimaculatus* expostos ao Zn, permitiu observação da correlação positiva entre a concentração de Zn e o aumento na ruptura e o deslocamento de cistos causando retração na parede dos túbulos seminíferos (SANTOS, 2009).

Tabela 4: Percentual de alterações histopatológicas dos testículos detectadas em *A. aff. bimaculatus* após exposição a tratamentos com diferentes concentrações de zinco (mg L⁻¹) por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

ESTÁGIOS	HISTOPATOLOGIAS	CONCENTRAÇÃO DO ZINCO (mg L ⁻¹)				
		0	5	10	15	20
I	Ruptura de Cisto	0,0	50,00	82,22	83,64	94,12
	Deslocamento da parede dos Túbulos	0,0	11,18	16,67	23,64	24,71
II	Retardo do desenvolvimento Gonadal	0,0	11,11	25,88	35,88	40,91
	Agrupamento Celular	0,0	37,65	45,88	62,73	77,78
	Núcleo Picnótico	0,0	21,11	41,76	47,65	75,45
	Vacuolização	0,0	71,18	90,00	96,47	98,18
	Muco	0,0	0,00	0,00	0,00	13,33
III	Degeneração	0,0	61,18	61,82	73,53	77,78
	Deslocamento de Cisto	0,0	1,76	1,82	2,94	6,67
	Destruição do Tecido Intertubular	0,0	45,29	45,88	60,00	75,56
	Desorganização dos Cistos	0,0	9,09	27,06	45,88	55,56
	Destruição dos Cistos	0,0	24,44	30,00	32,35	38,24

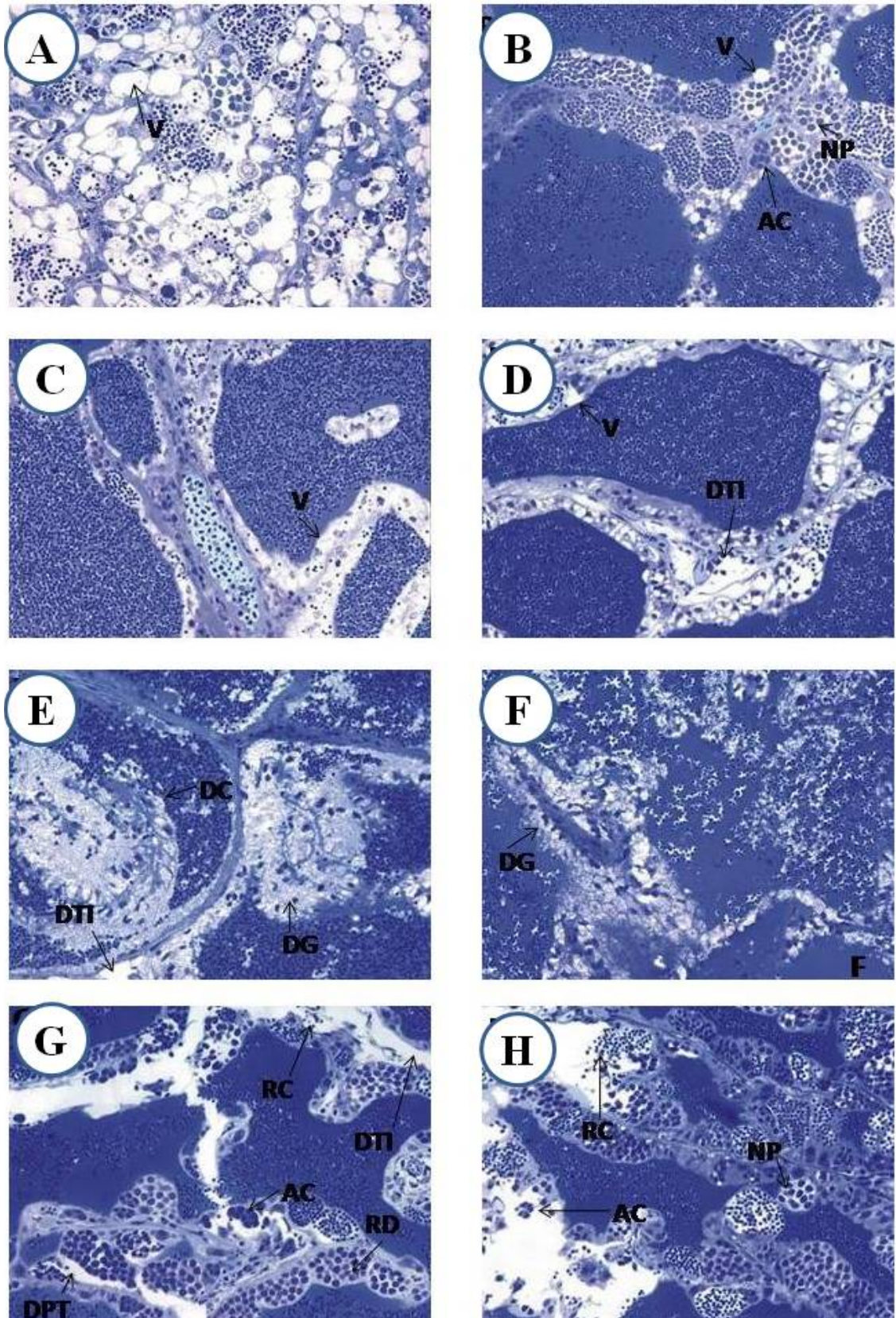


Figura 4: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de *A. aff. bimaculatus*, expostos a concentração de 10 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (AC) aglomeração celular; (V) vacuolização; (DPT) deslocamento da parede dos túbulos; (RC) ruptura de cisto; (DTI) destruição do tecido intertubular; (RD) retardo no desenvolvimento do cisto; (NP) núcleo picnótico; (DG) degeneração. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

Com o aumento das dosagens de Zn, foi observado acréscimo no percentual de degeneração e destruição do tecido intertubular dos peixes, que atingiu 70% ou mais dos animais no tratamento de maior dosagem (TAB. 4, FIG. 3, 4, 5 e 6). Estudos anteriores permitiram observar que indivíduos machos de *Puntius conchoni* expostos ao Zn apresentaram lesões permanentes e severas, como necrose e degeneração de túbulos seminíferos (KUMAR; PANT, 1984).

O Zn apresentou efeito negativo em relação ao desenvolvimento das células da linhagem germinativa, provocando retardo no desenvolvimento dos cistos, e causou a formação de agrupamentos celulares, devido ao comprometimento do processo de divisão celular que não se completou normalmente (TAB. 4, FIG. 3, 4, 5 e 6). Em estudo realizado com *A. aff. bimaculatus* expostos agudamente ao Zn foi possível observar existência de retardo no desenvolvimento das células da linhagem germinativa e a formação de aglomerados de células da linhagem germinativa causada pelo aumento da concentração de Zn (SANTOS, 2009). Foi observado, em indivíduos machos de *Puntius conchoni*, o desaparecimento de estágios intermediários entre espermatogônias e espermátides após dois meses de exposição ao cobre e o reaparecimento destes estágios intermediários após três meses de exposição (KUMAR; PANT, 1984). Estudo sobre o efeito de metais pesados em diversas espécies de peixes permitiu que se observasse que o processo de espermatogênese não prosseguiu além das espermatogônias, pois o mesmo foi interrompido pela morte celular (YAMAGUCHI *et al.*, 2007). Pesquisas sobre o efeito dos poluentes na reprodução dos peixes permitiram a constatação da interrupção da fase de proliferação na espermatogênese do *bluegill* (*Lepomis macrochirus*) após exposição aguda ao diazinon, inseticida organofosforado (DUTTA *et al.*, 2003). Exposições crônicas ao cádmio geraram inibição da espermatogênese em truta (*Oncorhynchus mykiss*) e em guppy (*Poecilia reticulata*) (BILLARD *et al.*, 1978). Substâncias tóxicas parecem atuar indiretamente sobre o equilíbrio entre os hormônios gonadotróficos, vitelogênicos, dopamina e estrogênio, o que se refletirá na diferenciação, maturação, morfologia e fisiologia gonadal (ADAMS, 1990), podendo, entretanto influir diretamente nas divisões celulares do tecido germinativo (BADRE; KUMAR, 1987).

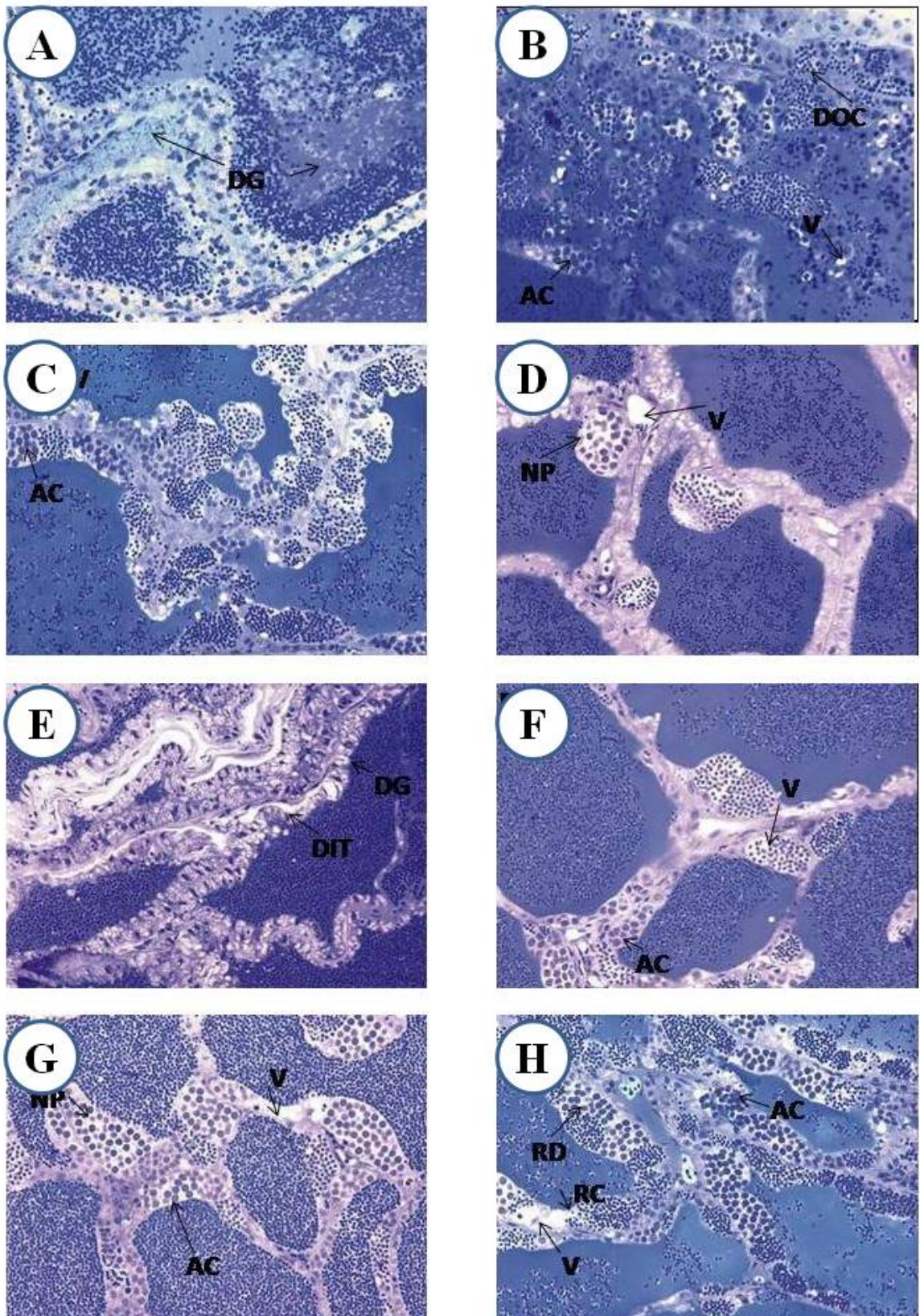


Figura 5: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de *A. aff. bimaculatus*, expostos a concentração de 15 mg L^{-1} de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (AC) aglomeração celular; (V) vacuolização; (DPT) deslocamento da parede dos túbulos; (RC) ruptura de cisto; (DIT) destruição do tecido intertubular; (RD) retardo no desenvolvimento do cisto; (NP) Núcleo picnótico; (DG) degeneração; (DOC) desorganização dos cistos. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

Houve redução do número de cistos nas diferentes concentrações de Zn quando comparadas ao grupo controle (TAB. 4). Em contrapartida, houve pequeno aumento de intertúbulo nos grupos submetidos aos tratamentos com 15 e 20 mg L⁻¹ (TAB. 5). Já foi observada redução significativa de cistos em *Lebistes reticulatus* (SEHGAL; SAXENA, 1986) e *A. aff. bimaculatus* (SANTOS, 2009) expostos a diferentes concentrações de Zn.

Ocorreu redução na produção espermática nos grupos tratados com 15 e 20 mg L⁻¹, e aumento nos grupos de 5 e 10 mg L⁻¹ quando comparados ao grupo controle. Em compensação, houve aumento do fluido testicular em todos os grupos tratados em relação ao grupo controle (TAB. 5). Os resultados observados nesta pesquisa também foram relatados em outro estudo onde se identificou redução na produção de espermatozóides nos grupos submetidos aos tratamentos com 10, 15 e 20 mg L⁻¹ e aumento na produção de líquido tubular nos túbulos seminíferos dos peixes tratados com dosagens agudas de 5, 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn (SANTOS, 2009).

Tabela 5: Percentual da constituição tecidual detectadas nos testículos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco na água (mg L⁻¹) por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

Constituição Tecidual (%)	Concentração de zinco (mg L ⁻¹)				
	0	5	10	15	20
Cisto	112,19 ^a	89,16 ^{ab}	74,68 ^b	59,52 ^b	60,33 ^b
Intertúbulo	38,71 ^a	18,72 ^b	28,53 ^{ab}	42,47 ^a	43,15 ^a
Espermatozóide	95,29 ^{ac}	136,83 ^{ba}	129,15 ^{ab}	88,58 ^{ac}	58,39 ^c
Fluido Testicular	19,81 ^a	21,27 ^a	33,62 ^a	59,78 ^b	104,12 ^c

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, p ≥ 0,05

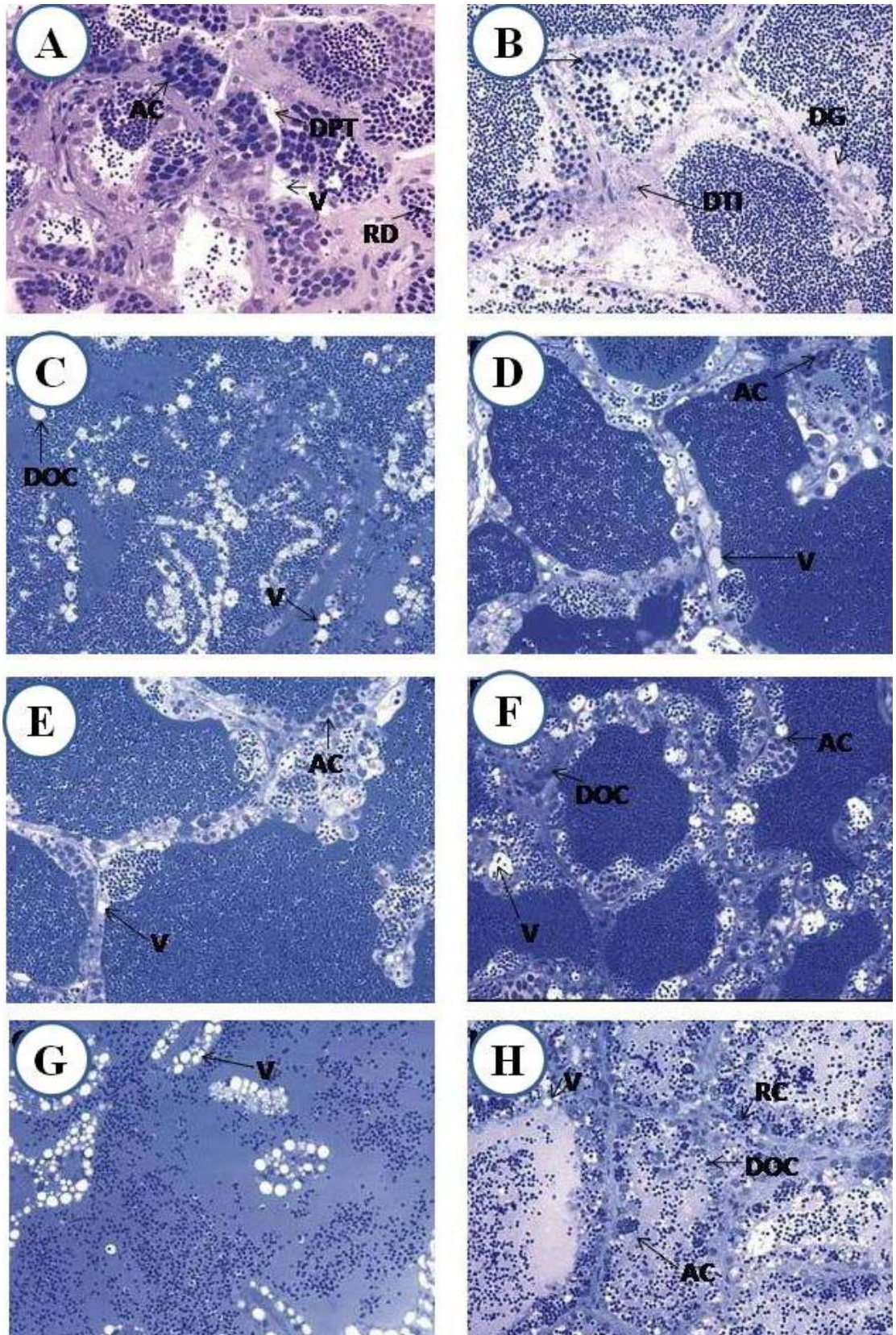


Figura 6: Fotomicrografias da organização estrutural do testículo de *A. aff. bimaculatus*, expostos a concentração de 20 mg L⁻¹ de zinco na água, após 30 dias de tratamento. (AC) aglomeração celular; (V) vacuolização; (DPT) deslocamento da parede dos túbulos; (RC) ruptura de cisto; (DTI) destruição do tecido intertubular; (RD) retardo no desenvolvimento do cisto; (DG) degeneração; (DOC) desorganização dos cistos. Coloração Azul de toluidina. Aumento: 280x.

Em relação ao índice gonadossomático (IGS₁ e IGS₂), houve aumento significativo em todos os grupos tratados ao comparar com o grupo controle (TAB. 6). De acordo com os resultados do IGS₂ há interferência das gônadas neste índice. Embora seja bastante comum a utilização do IGS como indicador do grau de desenvolvimento de peixes, ele não é sempre um índice confiável de atividade gonadal (DELAHUNTY; DE VLAMING, 1980; DE VLAMING *et al.*, 1982), particularmente com relação a indivíduos machos (MATTA *et al.*, 2009). Alterações no IGS são as conseqüências mais comuns observadas em peixes expostos a poluentes (KIME, 1995). Já foi observada redução nas concentrações do hormônio sexual no plasma e do índice gonadossomático de *Perca flavescens* após exposição crônica a diferentes metais (LEVESQUE *et al.*, 2006) e redução do IGS em *Channa punctatus* expostos ao mercúrio (RAM; SATHYANESAN, 1986; SAXENA; MANI, 1985) e em *Puntius ticto* e *Lebistes reticulatus* expostos ao cádmio (SEHGAL; PANDEY, 1984; PUNDIR; SAXENA, 1990).

Tabela 6: Índices Gonadossomáticos de machos de *A. aff. bimaculatus* após exposição a diferentes concentrações de zinco (mg L⁻¹) na água, por 30 dias. Sendo que entre o 15º e o 28º dia de exposição, os tratamentos que receberam 10 mg L⁻¹, 15 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ apresentaram, respectivamente, 62%, 85% e 100% de mortalidade.

	Concentrações de Zinco (mg L ⁻¹)				
	0	5	10	15	20
IGS ₁	0,96 ^a	2,31 ^b	2,46 ^b	2,74 ^b	3,15 ^b
IGS ₂	0,97 ^a	2,38 ^b	2,53 ^b	2,82 ^b	3,31 ^b

Letras iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Newman-Keuls, p_≥0,05

A Resolução CONAMA n° 357, de 17 de março de 2005, estabelece o valor máximo de 5 mg L⁻¹ de Zn para água própria para a criação de animais (CONAMA, 2005). No entanto, de acordo com nosso estudo, essa concentração de Zn na água comprometeu as funções reprodutivas da espécie havendo, portanto, a necessidade de revisão desta legislação brasileira.

CONCLUSÕES

O Zn mostrou-se altamente tóxico, em exposição subcrônica, para *A. aff. bimaculatus*, mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira.

A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao Zn provocou alterações histopatológicas severas e permanentes nos testículos, levando à redução na produção de espermatozoides, o que pode comprometer a taxa de fecundidade e provocar a extinção local da população.

O *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando exposta a baixas concentrações de Zn na água, sendo, portanto, adequado como bioindicador de ecossistemas aquáticos

Com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que o Zn afeta negativamente a reprodução desta espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S.M. Application of bioindicators in assessing the health of fish populations experiencing contaminant stress. In: MCCARTHY, J.F.; SHUGART, L.R. (Ed.). **Biomarkers of environmental contamination**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1990, pp. 333-353.

AGOSTINHO, A.; THOMAZ, S.; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, 1:70-78, 2005

AGUIAR, L.H. **Efeitos do inseticida organofosforado metilparation (FOLIOL 600) sobre o teleosteo de água doce, matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869): Aspectos do metabolismo intermediário**. 2002. 96p. Tese (Doutorado em Recursos Naturais)- Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002

AHSAN, S.N.; AHSAN, J. Degenerative changes in the testis of *Clarias batrachus* (Linn.) caused by cadmium chloride. **Indian Journal of Zoology**, 15:9-43, 1974.

ARANA, L.V. **Princípios químicos de qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis: UFSC, 2004, 231p.

BADRE, A.A.; KUMAR, K. Malathion toxicity: effect on the ovary of zebra fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie**, 72:517-528, 1987.

BILLARD, R. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING, G.E. (ed.) **Marshall's physiology of reproduction: Reproduction in males**. Edinburgh, Churchill Livingstone, 2:183-212, 1990.

CETESB. **Variáveis de qualidade das águas**. Disponível em <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp>>. Acesso em: acessado em 6 de julho de 2009

CHELLAPPA, S.; CHELLAPPA, N.T.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Reproductive plasticity of neotropical cichlids introduced to the semi-arid north-eastern Brazil. In: **VI International Congress on Biology of Fishes**, 2004, Manaus. Behaviour, physiology and toxicology interactions in fish. Vancouver : American Fisheries Society - Physiology Section, 2004. v. 1. pp. 149-154.

CONAMA - **Conselho Nacional do Meio Ambiente**. Resolução CONAMA nº357 de 17/03/05, 2005

CREASY, D.M. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: The appropriate use of spermatogenic staging. **Toxicologic Pathology**, 25:119-131, 1997.

DELAHUNTY, G.; DE VLAMING, V.L. Seasonal relationship of ovary weight, liver weight and fat stores with body weight in the goldfish, *Carassius auratus* (L.) **Journal of Fish Biology**, 16:5-13, 1980.

DE VLAMING, V., GROSSMAN, G.; CHAPMAN, F. On the use of gonadosomatic index. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 73(A):31-39, 1982.

DUTTA, H.M.; ADHIKARI, S.; SINGH, N.K.; ROY, P.K.; MUNSHI, J.S.D. Histopathological changes induced by Malathion in the liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 51:895-900, 1993.

FISHBASE. *Astyanax bimaculatus*. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=4475&genusname=Astyanax&speciesname=bimaculatus>>. Acesso em: maio 2009.

FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. **Células - Uma Abordagem Multidisciplinar**. Manole Editora. 2004, pp. 302-324.

HOAR, W.S.; RANDALL, D.J. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 1969, 485p.

KIME, D.E. The effects of pollution on reproduction in fish. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, 5:52-96, 1995.

KOULISH, S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H.J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, 254:292-311, 2002.

KUMAR, S.; PANT, S.C. Comparative effects of the sublethal poisoning of zinc, copper and lead on the gonads of the teleost *Puntius conchonius* Ham. **Toxicology Letters**, 23:189-194, 1984.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999, pp. 20-30.

LEVESQUE, H.M.; DORVAL, J.; HONTELA, A.; VAN DER KRAAK, G.J.; CAMPBELL, P.G. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca*

flavescens) to chronic environmental metal exposures. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 66(A):657-676, 2003.

MATTA, S.L.P. **Efeitos do hipotireoidismo induzido pelo PTU (6-n-propil-2-tiouracil) sobre a proliferação das células de Sertoli e células germinativas em tilápia (*Oreochromis niloticus*)**. 2000. 108p. (Tese doutorado em Biologia Celular). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

MATTA, S.L.P.; GOMES, M.L.M.; ANDRADE, D.R. Reproductive biology of *Oligosarcus argenteus* (Gunther, 1864) adult males and description of the gonadal maturation stages. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 52:119-126, 2009.

MIURA, T. Spermatogenic cycle in fish. In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Ed). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999, pp. 571-578.

MOREIRA, A.B.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. **Journal of Food Composition and Analysis**, 14:565-570, 2001

NAZ, R.K. **Endocrine disruptors: effects on male and female reproductive systems**. LLC: C.R.C Press. 1999, 358p.

OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura: fundamentos e técnicas de manejo**. Guaíba: Agropecuária, 1998. 211p

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIĆ, 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, 1994, pp.339-352

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, 6:459-497, 1995.

PUNDIR, R.; SAXENA, A.B. Seasonal changes in the testes of fish *Puntius ticto*, and their relation to heavy metal toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 45:288-93, 1990.

RAM, R.N.; SATHYANESAN, A.G. Effect of a mercurial fungicide on the gonadal development of the teleostean fish *Channa punctatus* (Bloch). **Ecotoxicol Environmental Safety**, 11:352-360, 1986.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. 666p.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, Clearwater, FL, 1990. 286p.

SANTOS, D.C.M. **Toxidez aguda do zinco em lambari *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. 2009. 115p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2009.

SEHGAL, R., TOMAR, V.; PANDEY, A.K. Comparative effects of two heavy metallic salts on the testis of viviparous teleost, *Lebistes reticularis* (Peters). **Journal of Environmental Biology**, 5:185-192, 1984.

SEHGAL, R.; PANDEY, A.K. Effect of cadmium chloride on testicular activities in guppy *Lebistes reticulatus*. **Comparative Physiology & Ecology**, 9:225-130, 1984.

SEHGAL, R.; SAXENA, A.B. Toxicity of Zinc to a Viviparous Fish, *Lebistes reticulatus* (Peters). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 36:888-894, 1986.

SHUKLA, J.P.; PANDEY, K. Arsenic induced cellular and biochemical changes during the testicular cycle of a freshwater perch, *Colisa fasciatus* (Bl. & Sch.). **Tools of Cell Biology**. 30:227-231, 1984c.

SHUKLA, J.P.; PANDEY, K. Carbamide induced histological alterations during different phases of the testicular cycle of a freshwater perch, *Colisa fasciatus* (Blo & Sch.). **Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica**, 23:181-6, 1984b.

SRIVASTAVA, A.K. Changes induced by lead in fish testis. **Journal of Environmental Biology**, 8:329-332, 1987.

TAKAYAMA, S; AKAIKE, M; KAWASHIMA, K.; TAKAHASHI, M.; KUROKAWA, K. A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. **Journal of the American College of Toxicology**, 14:266-292, 1995.

WALKER, C.H; HOPKIN, S.P.; SBLY, R.M.; PEAKALL, D.P. **Principles of ecotoxicology**. London: Taylor & Francis, 1996, 251p.

WELTZIEN, F.A.; ANDERSSON, E.; SHALCHIAN-TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain pituitary gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 137:447-477, 2004.

YAMAGUCHI, H.; UCHIHORI, Y.; YASUDA, N.; TAKADA, M.; KITAMURA, H. Estimation of yields of OH radicals in water irradiated by ionizing radiation. **Journal Radiation Research**, 46:333-341, 2005.

CONCLUSÕES GERAIS

O zinco mostrou-se altamente tóxico para *A. aff. bimaculatus*, em exposições subcrônicas, mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira.

Nos tratamentos contendo 5 e 10 mg L⁻¹ de zinco na água, houve maior acúmulo deste metal nos testículos, seguidos pelas brânquias, osso, cabeça e músculo. Nos tratamentos contendo 15 e 20 mg L⁻¹ de Zn na água, houve maior acúmulo de zinco nos tecidos branquiais seguidos de testículos, osso, músculo e cabeça. O fígado não apresentou acúmulo significativo em nenhum dos tratamentos.

A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao zinco provocou alterações histopatológicas severas e permanentes nas brânquias e no fígado comprometendo a função destes tecidos e causando a morte dos peixes; e nos testículos, o zinco causou a redução na produção de espermatozoides, o que pode comprometer a taxa de fecundidade e provocar a extinção local de populações da espécie.

Os resultados apresentados comprovam a acumulação crescente do zinco nos diferentes tecidos dos animais em estudo submetidos a exposição subcrônica (30 dias). Portanto, há necessidade de revisão desta resolução devido ao grande número de patologias identificadas nos órgãos estudados, considerados vitais para os peixes. Sendo assim, *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando exposta a concentração de 5 mg L⁻¹ de zinco, estabelecida pela Resolução CONAMA nº 357 de 17/03/2005 como máximo para água própria para a criação de animais e também para consumo humano.

ANEXOS

ANEXO A: ÍNDICES DE QUALIDADE DA ÁGUA AVALIADOS DURANTE O EXPERIMENTO COM *Astyanax aff. bimaculatus* EXPOSTOS AO ZINCO

Tabela 1: Oxigênio dissolvido (O_2 – $mg L^{-1}$), Nitrito (NO_2^-), dureza total (DT - $mg L^{-1}$ de $CaCO_3$), amônia tóxica (AT – $mg dm^3$), condutividade elétrica (CE- $\mu S cm^{-1}$) e pH na água dos aquários durante o período experimental de exposição de *A. aff. bimaculatus* a diferentes concentrações de zinco.

Concentração de Zinco ($mg L^{-1}$)	Características	Tempo(dias)					
		1	7	14	21	28	30
0	O_2	4,00	4,00	6,00	4,00	6,00	4,00
	NO_2^-	0,25	0,00	0,00	0,00	0,25	0,25
	D.T	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
	A.T	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001	0,002
	C.E.	65,40	66,50	70,70	70,10	71,00	71,00
	pH	6,09	7,12	6,48	6,75	6,39	5,79
5	O_2	4,00	1,00	11,00	4,00	4,00	4,00
	NO_2^-	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.T	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
	A.T	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,005
	C.E.	67,78	102,40	92,20	96,50	105,30	141,20
	pH	7,12	6,85	6,23	6,28	5,79	5,53
10	O_2	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00
	NO_2^-	0,25	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.T	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
	A.T	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,002
	C.E.	66,10	99,40	87,00	95,40	106,00	130,10
	pH	7,37	7,06	6,57	6,37	5,94	5,64
15	O_2	4,00	4,00	4,00	3,00	4,00	4,00
	NO_2^-	0,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.T	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
	A.T	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
	C.E.	88,10	92,50	86,60	104,00	108,00	135,00
	pH	7,17	7,09	6,59	6,47	6,21	5,61
20	O_2	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00
	NO_2^-	0,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	D.T	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
	A.T	0,002	0,003	0,001	0,001	0,001	0,005
	C.E.	85,60	117,50	112,50	122,30	140,20	166,00
	pH	7,21	7,09	6,43	6,21	5,71	5,34