

LUZ NATALIA FRANCO MONTOYA

**EFEITOS DO THIODAN[®] SOBRE A MORFOLOGIA DO TESTÍCULO DE
TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) SEXUALMENTE IMATURA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-graduação em
Medicina Veterinária, para obtenção
do título de “*Magister Scientiae*”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

LUZ NATALIA FRANCO MONTOYA

**EFEITOS DO THIODAN[®] SOBRE A MORFOLOGIA DO TESTÍCULO DE
TILÁPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*) SEXUALMENTE IMATURA**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de Pós-
graduação em Medicina Veterinária, para
obtenção do título de “*Magister
Scientiae*”.

APROVADA: 01 de agosto de 2008.

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta
(Co-orientador)

Prof^ª. Marlene Isabel Vargas Vitoria
(Co-orientadora)

Prof. Germán Arturo B. Mahecha

Prof^ª. Cleida Aparecida de Oliveira

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

A mi madre, Elena, por la vida, el cariño y el valioso tiempo compartido, por la educación y por la fuerza de tus palabras que siempre hacen bien.

A mis abuelos, Antonio y María, por su sabiduría y su eterno amor, compañía y apoyo incondicional, por los valores y la fortaleza que imprimen en la vida de quienes los rodea.

A Dios, por el milagro de la vida que los ha mantenido a mi lado siempre y para que éste continúe sucediendo.

*A ti luz de mi vida,
que me inspiras a soñar
A ti mi linda Nataly...
por la tierna madurez
que día a día te dio fuerza y
paciencia para volver con mamá.*

Agradecimientos

A Dios por la valiosa oportunidad de llegar hasta este punto del camino, la fuerza y la sabiduría que cada día se adquieren durante todo este proceso, bienaventurados todos los que en la gloria del señor disfrutaban día a día del amor y la compañía de sus seres queridos. Gracias infinitas doy a la vida que me permite regresar con los míos.

Agradezco con todo mi corazón a mi compañero Mario Alberto, por haberme dado la fe de sus palabras durante todos los días que pasamos separados, por haber creído en mí, incluso más que yo misma y por nunca haberme desamparado, ni el tiempo ni la distancia fueron suficientes para sentirme lejos de ti. Gracias por todo vida.

A mi profesor orientador, Laércio, que más que un tutor, ha sido y será siempre un amigo, un gran amigo, aquel que tiende la mano sin importar a quien, como o porque, siempre está allí, dispuesto a ayudar y a dar de sí mismo un poco para facilitar la vida de quienes lo rodean, gracia profesor por todo lo recibido, por la orientación en mi trabajo y estudios, pero sobre todo por el cariño y la amistad. A su linda familia Teresa, Clarice, Anita y Estêvão, que con sus sonrisas y buenas maneras me hicieron sentir como en casa, a todos mil gracias.

A mi súper amiguita Viví, que dio paso a paso y creció conmigo, porque sin su valiosa ayuda con certeza las cosas hubieran sido muchísimo más difíciles. A mis consejeros Sérgio y Marlene que me llevaron de la mano enseñándome a vivir y a ver que todo siempre tiene una solución, que los obstáculos son sólo tan grandes como queremos verlos, gracias de corazón.

A todas aquellas personas que de cierto modo ayudaron para que este trabajo pudiera ser llevado a cabo, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

Biografia

Luz Natalia Franco Montoya nasceu na Colômbia, em 25 de setembro de 1979. Filha de Maria Elena Montoya e Elias Franco Ortiz. Mãe de Nataly, de sete anos. Em 3 de junho de 2005, obteve o título de “Médica Veterinária Zootecnista” na Universidade de Caldas, Colômbia. Foi professora nesta mesma Instituição, nas áreas de “Morfologia dos Animais Domésticos” e “Cirurgia de Pequenos Animais” enquanto cursou estudos de pós-graduação em Docência Universitária enfatizando a área de educação virtual. Luz Natalia ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da UFV no segundo período de 2006, área de concentração em Morfofisiologia de Animais Domésticos e Selvagens, sob a orientação do professor Laércio dos Anjos Benjamin. Atualmente, exerce atividades de pesquisa no Departamento de Saúde Animal da Universidade de Caldas, Colômbia.

ÍNDICE

Resumo	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
Abstract	viii
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	2
REVISÃO DE LITERATURA	2
O uso de agrotóxicos na agricultura	2
Transporte e destino dos agrotóxicos no ambiente aquático	3
Estudos de toxicidade aquática.....	3
Caracterização do agrotóxico Thiodan®	4
Mecanismo de ação e usos do endosulfan	5
Toxicidade aguda do endosulfan	6
Efeitos do endosulfan sobre organismos aquáticos.....	6
A tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>).....	7
Testículos dos teleósteos	9
Desenvolvimento dos testículos.....	9
Estrutura do testículo em teleósteos.....	9
Aspectos gerais da espermatogênese	12
Espermatogênese em teleósteos.....	13
OBJETIVOS	15
Objetivo geral	15
Objetivos específicos.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO II	22
Morfologia testicular de tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>) sexualmente imatura.	22
Resumo	22
Abstract	23
Introdução	24
Material e métodos	24
Animais.....	24
Condições laboratoriais	25
Obtenção de dados biométricos	25
Coleta das gônadas e microscopia de luz.....	26
Análises morfométricas	26
Análises estatísticas	27
Resultados e discussão.....	29
Qualidade da água	29
Dados biométricos	30
Morfologia dos testículos	31
Desenvolvimento gonadal inicial em tilápia.....	34
Morfometria testicular	39
Proliferação de células germinativas	40

Conclusões.....	42
Referências Bibliográficas.....	44
<i>CAPÍTULO III</i>	48
Efeitos do Thiodan [®] sobre a morfologia testicular de tilápia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>) sexualmente imatura: análises morfométricas e histopatológicas.....	48
Resumo	48
Abstract	49
Introdução.....	51
Material e métodos	52
Animais.....	52
Condições laboratoriais	53
Tratamentos do teste de toxicidade aguda em sistema estático	53
Obtenção dos dados biométricos	54
Coleta de gônadas e microscopia de luz	54
Análises morfométricas	55
Análises histopatológicas.....	56
Análises estatísticas	56
Resultados e discussão.....	57
Qualidade da água	57
Toxicidade do endosulfan e seu efeito no comportamento dos peixes expostos	60
Dados biométricos e análises morfométricas dos testículos	61
Quantificação de células germinativas.....	64
Análises histopatológicas.....	65
Conclusões.....	71
Referências bibliográficas	72
<i>CONCLUSÕES GERAIS</i>	77

Resumo

Franco Montoya, Luz Natalia, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Agosto de 2008. **Efeitos do Thiodan® sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sexualmente imatura.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-orientadores: Marlene Isabel Vargas Vilorio, Sérgio Luis Pinto da Matta e Ann Honor Mounteer.

Objetivou-se avaliar os efeitos tóxicos causados pela exposição aguda ao agrotóxico endossulfan na sua formulação comercial Thiodan®, em indivíduos machos sexualmente imaturos de tilápia nilótica. Os peixes foram aclimatados por um período de 10 dias às condições do laboratório onde foram mantidos em aquários de vidro com capacidade para 50L de água, com filtração e aeração contínuas, a uma temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH em torno de 7.0 e oxigênio dissolvido de $6,4 \pm 0,8$ mg/L. Os peixes foram divididos em 4 grupos, tendo um grupo-controle e três expostos durante 96h. a concentrações crescentes do tóxico (0,5µg/L, 1,0µg/L e 1,4µg/L). No grupo exposto a 0,5µg/L, observaram-se áreas circunscritas de necrose nos testículos de alguns animais. Nos grupos expostos a 1,0µg/L e 1,4µg/L foram evidenciadas alterações na estrutura dos espermatozoides, diminuição na população de espermatogônias primárias, diminuição na área testicular, assim como graves perdas da funcionalidade tecidual por necrose e dano no tecido conjuntivo. Nos casos mais graves, observou-se necrose severa do testículo, com perda parcial ou total do mesotélio. No presente estudo, foram constatados efeitos negativos do Thiodan® sobre a morfofisiologia do testículo de tilápia nilótica sexualmente imatura.

Abstract

Franco Montoya, Luz Natalia, M.Sc. University Federal of Viçosa, August 2008.
Effects of Thiodan[®] on the testis morphology of sexually immature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Advisor: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisors: Marlene Isabel Vargas Vilorio, Sérgio Luis Pinto da Matta and Ann Honor Munteer.

The purpose was to evaluate the toxic effects caused by the acute exposition to the agrochemical endosulfan in its commercial formulation Thiodan[®], in Nile tilapia sexually immature male individuals. The fishes were acclimatized during a 10 day period on laboratory conditions where they were maintained in glass aquariums with 50L water capacity, with continuous filtration and aeration, in a approximated temperature of $26 \pm 1^\circ\text{C}$, pH around 7.0, and dissolved oxygen of $6,4 \pm 0,8$ mg/L. The fishes were divided in 4 groups, including a control group and three others exposed during 96h. at increasing toxic concentrations (0,5 $\mu\text{g/L}$, 1,0 $\mu\text{g/L}$ e 1,4 $\mu\text{g/L}$). On the 0,5 $\mu\text{g/L}$ exposed group were observed circumscribed areas of necrosis on the testes of some animals. On the 1,0 $\mu\text{g/L}$ and 1,4 $\mu\text{g/L}$ exposed groups, were found structural alterations on the spermatocysts, decreased primary spermatogonia populations, decreased testis area, as well as serious loss of tissue functionality because of necrosis and damage on the connective tissue. On the more serious cases, was observed severe necrosis of the testis with partial or total loss of the mesothelium. On the present study, the negative effects of Thiodan[®] over the testis morpho physiology of sexually immature Nile tilapia, was confirmed.

INTRODUÇÃO GERAL

O uso de agrotóxicos na agricultura está desencadeando uma série de prejuízos para o meio ambiente, que representam séria ameaça, para a sobrevivência dos ecossistemas. O meio aquático é considerado o mais relevante compartimento receptor de tóxicos, pois substâncias químicas lançadas no ar ou no solo irão atingi-lo através das chuvas, lavagem do solo e infiltrações, gerando perturbações da relação predador-presa, perda de biodiversidade, além de conseqüências graves para a saúde humana.

No ambiente aquático degradado, onde ocorrem poluentes em concentrações crônicas ou subletais, uma população de peixes exposta ao tóxico pode apresentar mudanças na estrutura morfológica dos seus órgãos internos. Assim, a aplicação de métodos de análise dos efeitos dos poluentes que avaliem as alterações morfológicas dos órgãos de peixes, é útil como biomarcador de poluição ambiental. HINTON & LAURÉN (1990), o termo biomarcador se refere aos órgãos que sofrem alterações morfológicas e funcionais nas células e/ou tecidos em conseqüência da exposição a um contaminante. Em peixes, fatores como estresse, jejum, agentes tóxicos, luz, temperatura, confinamento e níveis hormonais inadequados podem afetar a reprodução (NAGAHAMA, 1983). Apesar disso, estudos *in situ* ou experimentais que demonstrem os efeitos de agrotóxicos sobre órgãos de espécies de animais aquáticos, entre eles os peixes, são escassos, sendo menos comuns, aqueles que enfocam eventos morfológicos ocasionados por tais produtos nas gônadas, que podem comprometer o processo reprodutivo.

Parte dos agrotóxicos aplicados nas lavouras, como o endossulfan, podem atingir os reservatórios de água na propriedade agrícola. O endossulfan é um dos inseticidas mais utilizados para controle de pragas na cultura do café. Embora os mecanismos de toxicidade do endossulfan sejam extensivamente estudados (NAQVI e VAISHNAVI, 1993), poucos trabalhos têm sido conduzidos com o objetivo de se avaliar efeitos histopatológicos dos agrotóxicos em peixes, especialmente em gônadas. O estudo das características morfológicas dos testículos de tilápia nilótica jovem em condições naturais e expostos ao inseticida endossulfan poderá, portanto, fornecer informações importantes para o entendimento dos efeitos provocados por esses produtos nas gônadas dos peixes e como eles podem comprometer o desenvolvimento gonadal e o processo reprodutivo.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

O uso de agrotóxicos na agricultura

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, agroquímicos, praguicidas, pesticidas, desinfestantes ou biocidas são denominações dadas às substâncias ou misturas de substâncias, naturais ou sintéticas, destinadas a repelir ou combater pragas, que podem consumir ou deteriorar materiais usados pelo homem, ou são vetores de doenças transmitidas ao homem ou aos animais domésticos. Os praguicidas são classificados de acordo a praga que combatem como algicidas, herbicidas, fungicidas, nematocidas, inseticidas e rodenticidas (KOTAKA e ZAMBRONE, 2001). Estas denominações podem ser enganosas, uma vez que esses produtos têm ação no meio ambiente, agindo além do seu alvo específico. Este conjunto de produtos químicos recebeu denominações de defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, produtos fitossanitários ou agrotóxicos, sendo este último termo restrito ao Brasil (Lei n. 7.802/89).

Inseticidas constituem importante grupo de praguicidas para o uso agrícola, que ano após ano mostra um aumento progressivo em seu uso para labores do campo na América do Sul sendo que, nas últimas décadas, começaram a substituir o trabalho mecânico e manual dos agricultores. RÜEGG et al. (1987) e TOMITA & BEYRUTH (2002) relatam que o modelo de agricultura adotado no Brasil baseia-se no uso de agrotóxicos.

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

eficiência de controle das plantas daninhas e pragas quando comparado aos demais métodos convencionais de controle (SANTOS, 2004).

Para ROSA (1998), o modelo baseado no uso intensivo de insumos químicos, de sementes melhoradas e de mecanização, foi denominado “Revolução Verde”, que na década de mil novecentos e oitenta trouxe ao Brasil um novo alento em relação à produtividade, com grandes esperanças de colheitas fartas e novas tecnologias que propiciaram o domínio de áreas pouco exploradas, como por exemplo, o cerrado da região centro-oeste. De fato, muitas destas expectativas se realizaram, entretanto, o impacto ambiental propiciado trouxe conseqüências como a perda de biodiversidade e a exaustão de vários cursos de água por assoreamento, além de contaminação dos terrenos e dos rios.

Transporte e destino dos agrotóxicos no ambiente aquático

O transporte e o destino dos agrotóxicos no ambiente aquático é ponto de discussão. MURTY (1988) descreveu que os agrotóxicos entram no ambiente aquático através da aplicação intencional, implemento aéreo, escoamento das aplicações ou liberação accidental. A descarga dos resíduos da manufatura de agrotóxicos constitui a segunda maior fonte de contaminações dos corpos de água.

Para VASCONCELLOS (2000), os resíduos destas substâncias presentes nas águas podem tornar-se aderidos ao material orgânico em suspensão, depositar-se no sedimento ou serem absorvidos pelos organismos. Assim, peixes e invertebrados podem acumular tais compostos ligados à matéria ingerida, absorve-los passivamente pela superfície corporal ou durante as trocas respiratórias.

Estudos de toxicidade aquática

O estudo dos efeitos de agentes tóxicos sobre a vida aquática pode ser realizado através de ensaios biológicos "in loco" ou em condições laboratoriais, sendo estes últimos mais utilizados por permitirem um controle mais efetivo dos fatores ocasionais, como temperatura, pH, duração de exposição, meio, concentração. Ao se avaliar a toxicidade de agentes tóxicos ou misturas destes frente a um reativo biológico, geralmente se utiliza uma população homogênea, possuindo uma sensibilidade definida,

determinando-se a concentração responsável por um efeito tóxico (efeito letal, sub-letal, crônico, imobilização ou modificação do comportamento, dentre outros). Estes experimentos podem ser realizados utilizando-se sistemas de fluxo contínuo, semi-estático ou estático. Quanto ao meio, pode-se utilizar meio aquático do tipo água continental (água dura, rica em bicarbonatos e sulfatos dissolvidos; e água mole, isenta de íons cálcio e magnésio), marinha ou salobra, segundo as necessidades dos organismos avaliados (CETESB, 2006). Por razões técnicas e econômicas, é impossível testar todas as espécies que fazem parte do ecossistema aquático. Assim, para esses estudos são relacionados, normalmente, os organismos mais representativos de cada nível trófico na cadeia alimentar, como algas, micro-crustáceos e peixes.

Caracterização do agrotóxico Thiodan[®]

O Thiodan[®] (endosulfan) é um inseticida acaricida organoclorado, do grupo químico éster do ácido sulfuroso de um diol cíclico, conhecido também como grupo dos ciclodienos. Este grupo de inseticidas surgiu após a segunda guerra mundial: chlordane, 1945, aldrin e dieldrin, 1948; heptachlor, 1949; endrin, 1951; mirex, 1954; endosulfan, 1956; e chlordecone, 1958. Sua formulação é do tipo concentrado emulsionável, registrado no Ministério da Agricultura sob o n. 10487, liberado comercialmente para o MERCOSUL. A concentração de ingrediente ativo é de 350g/L, apresentando classificação toxicológica I (extremamente tóxico), classificação ambiental I (altamente perigoso ao meio ambiente), além de inflamável e corrosivo (ENGELHARDT e SARMENTO, 2004).

O endosulfan, inseticida desenvolvido pela Hoechst Aktiengesellschaft na Alemanha, foi introduzido no mercado em 1957 com o nome comercial de Thiodan[®] (GOEBEL et al., 1982; STUMPF e ABHAVER, 1986). O ingrediente ativo do Thiodan consiste na mistura de dois isômeros de endosulfan, sendo 70% de α -endosulfan e 30% de β -endosulfan misturado com (1, 4, 5, 6, 7, 7 - hexachloro - 8, 9,10 - trinorborn-5 - en -2,3-ylenebismethylene) sulfato, composição que potencializa a sua ação tóxica (BAYER, 2008)

Entre os produtos derivados do metabolismo do endosulfan em mamíferos, o sulfato de endosulfan é um dos principais metabólitos devido à sua importância toxicológica (GOEBEL et al., 1982; STUMPF e ABHAVER, 1986).

A Legislação Brasileira de Resíduos de Pesticidas vigente, levando em consideração a qualidade da água definida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução CONAMA - nº 20 de 18/06/1986, estabelece o valor limite de 0,056 µg/L de resíduo do referido inseticida e seus metabólitos (BRASIL, 1988).

Mecanismo de ação e usos do endosulfan

No sistema nervoso, a transmissão de impulsos é mediada por neurotransmissores, alguns deles excitatórios, outros inibitórios. O GABA (ácido gama-aminobutírico), é um dos principais transmissores inibitórios no cérebro e medula espinhal. Diferentes autores relatam o mecanismo de ação dos organoclorados do grupo dos ciclodienos agindo sobre o mecanismo inibidor do quimiorreceptor GABA. Esse mecanismo consiste em um estímulo inibitório que leva a uma hiperpolarização da membrana do axônio através do aumento da permeabilidade dos íons Cl⁻ para o interior da membrana (WARE, 2004). Esse efeito inibitório bloqueia o excitatório (DOWSON, 1977). Ciclodienos ligam-se ao sítio de ligação dos receptores/canais GABA individuais induzindo uma rápida mudança conformacional do canal para o estado desensibilizado, suprimindo o fluxo de Cl⁻ para o interior da membrana (BLOOMQUIST, 1996). Conseqüentemente, há propagação contínua do impulso nervoso, interferindo sobre a atividade nervosa do animal, gerando tremores, convulsões, prostração e posteriormente a morte, como observado em insetos, mas afetando também qualquer tipo de crustáceo, peixe e mamífero, inclusive por exposição a baixas concentrações (ETO, 1990; PINHEIRO et al., 1998). Segundo WARE (2004) e COUTINHO et al. (2005), ao contrário do DDT, o efeito dos ciclodienos é diretamente proporcional à temperatura, ou seja, quanto mais alta a temperatura, mais tóxicos se tornam.

Segundo SINGH et al., (1990) o endosulfan é um composto xenobiótico que encontra-se na lista de substâncias que possuem a capacidade de interferir na ligação de hormônios nos seus receptores, alterando o ciclo hormonal nos animais e no homem (disruptores endócrinos). Estes autores observaram em mamíferos que o endosulfan é importante inibidor da síntese de andrógenos testiculares, e contribui para a diminuição intensa dos níveis de gonadotropinas plasmáticas (FSH e LH), junto com testosterona plasmática e testicular, em ratos.

O endosulfan é o único inseticida organoclorado que ainda é amplamente

utilizado no mundo (CAPKIN et al., 2006). Segundo a BAYER (2006), fabricante do produto, o Thiodan® (endosulfan) é um inseticida para o controle de insetos chupadores e mastigadores, com ação de contato e ingestão. Recomenda seu uso especialmente em cultivos de café, cana de açúcar, hortaliças, frutas, vinhas e forragens. Adverte também que não se devem coletar frutos ou vegetais tratados até 21 dias após a última aplicação.

Toxicidade aguda do endosulfan

Está comprovado que o potencial tóxico dos organoclorados ameaça o equilíbrio ecológico da biosfera e a saúde humana, por serem onipresentes, fracamente biodegradáveis e apresentarem efeito tóxico mesmo em pequenas doses. Além disso, podem se acumular tanto nos organismos vivos (bioacumulação) quanto ao longo da cadeia alimentar (biomagnificação) (CETESB, 2006). Concentrações elevadas de compostos organoclorados são pouco freqüentes no meio natural, mas a sua retenção nos sedimentos causa contaminação, a longo prazo, dos ambientes aquáticos com conseqüências diretas e indiretas sobre os organismos encontrados nestes ecossistemas (BROWN et al., 2000; FLEEGER et al., 2003).

O endosulfan pertence à Classe Toxicológica I, sendo altamente tóxico para animais aquáticos e terrestres (espécies não-alvo) segundo a Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, 2000), possuindo de moderado a alto risco e efeitos agudos e crônicos. SOARES et al. (2003) demonstraram que o endosulfan adere às partículas do solo e matéria orgânica, levando anos para sua degradação.

Efeitos do endosulfan sobre organismos aquáticos

Segundo CAPKIN et al. (2006), variáveis como alcalinidade e temperatura da água, e o menor tamanho dos espécimes aumentam a toxicidade do endosulfan nos peixes. Para CENGIZ et al. (2001), os efeitos do thiodan são tempo e dose dependentes. CAPKIN et al. (2006) reportaram uma CL₅₀ de 19,78 µg/L para *Oncorhynchus Mikyss*, para 24 horas de exposição ao tóxico, o que causou além da morte de 50% dos animais, convulsões, nado errático, edema e separação das lâminas branquiais, edema e necrose do fígado, dos túbulos renais e do tecido hematopoético. CENGIZ et al. (2001) reportaram lesões similares em brânquias do peixe-mosquito *Gambusia affinis*, além de

congestão e hipertrofia do fígado. DUTTA et al. (2006) descreveram num estudo de toxicidade crônica, as injúrias causadas pelo endossulfan sobre os túbulos seminíferos do peixe “bluegill” *Lepomis macrochirus*, e relataram alteração dos túbulos seminíferos, que mostraram perda dos padrões normais de organização celular, diminuindo também o diâmetro das espermatogônias primárias gradativamente, desde as primeiras 24 horas de exposição até as duas semanas seguintes. Segundo os autores, este tipo de dano pode afetar as espermátides e os espermatozóides, apresentando no final um impacto negativo na espermatogênese e fertilidade do macho, comprometendo o número da população do “bluegill” *Lepomis macrochirus*.

MUSANHI (1987) determinou a CL₅₀ para tilápia nilótica após 96, 48 e 24 horas de exposição ao endossulfan como sendo de 1,42, 3,80 e 10,3 µg/L respectivamente. Comparando a toxicidade deste agroquímico com a do lindano, outro organoclorado muito utilizado na agricultura, concluindo que o thiodan é muito mais tóxico para este peixe que o lindano, embora seja mais biodegradável do que este último.

PINHEIRO et al. (1998) advertem, com veemência, sobre o perigo de contaminação do Pantanal e da Amazônia - lugares ricos em recursos hídricos - por produtos à base de endossulfan, pois este produto é extremamente tóxico para peixes e outros organismos aquáticos, mesmo em doses muito pequenas. Estes autores citam que a toxicidade se dá mesmo com doses inferiores a centésimos de picograma/L.

A tilápia nilótica (Oreochromis niloticus)

Os teleósteos incluem mais de vinte mil espécies, constituindo, assim, o maior e provavelmente mais diversificado e antigo grupo de vertebrados. O habitat destes vertebrados é bastante variado sugerindo que ao longo de sua história evolutiva os peixes desenvolveram um eficiente processo adaptativo ao meio ambiente. Desta forma, os mesmos foram capazes de colonizarem e de se reproduzirem numa variedade muito grande de microambientes (BILLARD, 1986).

A tilápia nilótica (*O. niloticus*) é um peixe teleósteo pertencente à ordem Perciformes, família Cichlidae e à subfamília Tilapiinae. (TREWAVAS, 1983). Seu cultivo, que remonta mais de 3000 anos no Egito, está atualmente espalhado por quase todos os países do mundo. A produção total mundial de tilápias só é menor que a de

carpas e de salmonídeos, tendo aumentado drasticamente, chegando mesmo a dobrar entre 1986 e 1992 (ENGLE, 1997). Constitui uma das espécies de peixe mais produzidas no mundo devido às boas características organolépticas de sua carne (TORRANS, 1998; FAO, 2003), o que faz da tilápia uma espécie promissora para a aquicultura do século XXI (FITZSIMMONS, 2000).

Em 1990, a produção mundial de tilápias foi estimada em 855.000 t/ano, sendo que 390.000 t vieram de cultivo. A FAO relatou o aumento na produção de tilápias para 1.100.000 t em 1994, ou seja, um incremento de 245.000 t, atribuído exclusivamente à aquicultura. No Brasil, a produção anual de tilápias cultivadas supera inclusive a de carpas (50.400 t), com aproximadamente 64.857 t, o que representa 37.88% da produção aquícola total do país (FAO, 2003). Algumas estimativas sugerem que a captura em reservatórios brasileiros se iguala à produção em cultivo. Embora a tilápia nilótica tenha sido introduzida no Brasil em 1971, a produção comercial emergiu de modo significativo somente a partir da década de 1990 (BOSCOLO et al., 2001), na medida em que os produtores assimilaram a reversão sexual e outras tecnologias modernas de produção. Segundo dados da FAO (2003), o Estado do Ceará é o principal produtor de tilápia com 13 000 toneladas/ano, seguido pelo Paraná (12 780 toneladas/ano) e São Paulo (9 740 toneladas/ano).

O Brasil oferece condições altamente favoráveis para seu cultivo, motivo pelo qual a tilápia nilótica foi recentemente indicada pelo Ministério da Agricultura como o principal peixe para abastecimento da cadeia produtiva do pescado de água doce, tendo sido alocados financiamentos para pequenos produtores que se interessam em cultivar essa espécie.

Como consequência da maior produção, o mercado consumidor de tilápias tem aumentado consideravelmente em diversos países. Nos Estados Unidos, boa parte das tilápias é importada de países latino-americanos e asiáticos, na forma de filé e de peixes inteiros. Em 1995, a tilápia foi o peixe mais procurado pelos norte-americanos devido ao sabor agradável de sua carne (ENGLE, 1997).

Do ponto de vista biológico, a tilápia nilótica é um teleósteo de águas quentes que, em condições de cultivo, apresenta crescimento rápido, grande versatilidade alimentar, tolerância a baixos teores de oxigênio dissolvido e a grandes variações nas condições ambientais, tamanho conveniente, carne saborosa (BEAMISH, 1970; SILVA, 1987) e facilidade para a desova, o que a torna muito interessante para a exploração

comercial na piscicultura, atingindo um considerável aumento nos países tropicais da América do Sul.

A tilápia nilótica é onívora, alimentando-se de algas, fitoplâncton, zooplâncton, ovos e larvas de peixes e detritos. Sendo onívora, ela é capaz de crescer rapidamente com níveis muito baixos de proteínas e de tolerar altos níveis de carboidratos na dieta, se comparada aos peixes carnívoros cultivados atualmente (STICKNEY, 1997).

Sexualmente, as tilápias se caracterizam por apresentarem cuidado parental bucal desenvolvido pela fêmea e se reproduzirem ao longo do ano (TREWAVAS, 1983). O peixe atinge a maturidade sexual entre quatro e cinco meses de idade, e as desovas ocorrem de dois em dois meses se a temperatura da água permanecer acima de 24°C (PULLIN, 1991). A precocidade reprodutiva dessa espécie e a alta viabilidade de suas larvas fizeram dela um excelente modelo experimental para se investigar a biologia reprodutiva de peixes teleósteos com alto potencial produtivo (STICKNEY, 2000).

Testículos dos teleósteos

Desenvolvimento dos testículos

Um dos fatores que garante o sucesso reprodutivo dos animais sexualmente adultos de qualquer espécie é o desenvolvimento normal das gônadas que se inicia nos primeiros estágios de formação do embrião e envolve um processo de diferenciação bastante complexo (DEVLIN e NAGAHAMA 2002).

Nos peixes teleósteos, como em outros vertebrados, as células germinativas primordiais originam-se do mesoderma extra-embriônico, no início da gastrulação e migram para a crista genital (NAKAMURA et al., 1998). Ao colonizar a gônada primitiva, essas células associam-se às células mesenquimais e passam a ser chamadas de gonócitos, os quais potencialmente podem se diferenciar em ovogônias ou espermatogônias (FOYLE, 1993).

Estrutura do testículo em teleósteos

Geralmente, os testículos dos peixes estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestivo, ventralmente aos rins e ventro-lateralmente 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 e LOIR, 1999).

Na tilápia nilótica, os testículos são pares e alongados, de superfície lisa e apresentam tamanho semelhante entre o direito e o esquerdo. Cada testículo apresenta uma extremidade cranial afilada, uma parte média de forma triangular e uma porção caudal que se afila gradualmente até unir-se à do outro testículo, formando um ducto único que desemboca na papila urogenital (SILVA, 1987).

Externamente, este órgão é revestido por uma túnica albugínea da qual partem septos fibrosos em sentido radial, que percorrem o interior do órgão até atingir o lado oposto, dividindo o testículo em lóbulos incompletos (SILVA, 1987). Os lóbulos testiculares são preenchidos por túbulos seminíferos, os quais apresentam paredes formadas por cistos que se apóiam na lâmina basal e que são revestidos por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (MATTA, 2000).

Segundo PUDNEY (1995), nos peixes teleósteos, as células de Sertoli, unidas entre si por complexos juncionais especializados, delimitam física e funcionalmente os espermatocistos ou cistos espermatogênicos. Desta forma, as células de Sertoli fornecem às células germinativas suporte físico e fatores importantes para a sobrevivência, proliferação e diferenciação das mesmas, estando ainda envolvidas na intermediação hormonal e na fagocitose de restos celulares (WELTZIEN et al., 2004). As células de Sertoli que delimitam os cistos espermatogênicos se apóiam na túnica própria, que é constituída pela membrana basal (camada acelular) e pelas células peritubulares mióides que possuem capacidade contrátil (BILLARD, 1986; PUDNEY, 1995; LE GAC e LOIR, 1999). Portanto, diferente dos mamíferos, em peixes as espermatogônias diferenciadas (a partir de espermatogônia primária) não estão em contato com a membrana basal (BILLARD, 1986).

Os componentes básicos do testículo são comuns a todos os peixes e aos demais vertebrados. Este órgão tem as funções espermatogênica e androgênica, possuindo dois compartimentos principais: o compartimento intersticial e o compartimento tubular. No compartimento intersticial ou intertubular estão situados vasos sanguíneos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo, além das células de Leydig que possuem

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

Aspectos gerais da espermatogênese

O processo espermatogênico é um evento cíclico complexo, altamente organizado e coordenado, no qual as espermatogônias diplóides se diferenciam em espermatozóides maduros. Durante sua evolução, a espermatogênese pode ser dividida funcionalmente em fases como: a) Fase proliferativa (espermatogonial), na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; b) Fase meiótica (espermatocitária), na qual o material genético dos espermatócitos é recombinado e segregado; e c) Fase de diferenciação (espermio gênica), na qual espermátides são transformadas em células estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o ovócito (RUSSELL et al. 1990), os espermatozóides.

Este processo se inicia com a divisão da espermatogônia-tronco (primária) ou espermatogônia de tipo A, conhecida também como G₁, dando origem às espermatogônias proliferativas. Estas últimas sofrem sucessivas divisões mitóticas, e dão origem às espermatogônias (secundárias) ou do tipo B, também chamadas G₂, comprometidas com a formação de espermatozóides. Pontes intercelulares, junções citoplasmáticas entre as células germinativas vizinhas promovem a sincronia no desenvolvimento celular, sendo encontradas tanto nas espermatogônias secundárias quanto nos espermatócitos, e permanecem até a fase de espermátides, quando são rompidas em função da fase de diferenciação das células em espermatozóides (RUSSELL et al. 1990).

As células-tronco são relativamente resistentes a variações ou injúrias teciduais e freqüentemente sobrevivem quando outras células de tipo germinativo tenham entrado em depleção. Essa resistência ocorre, provavelmente, por sua infreqüente divisão, já que muitas substâncias adversas afetam as células em fases diferentes do ciclo celular. A destruição completa destas células-tronco resulta na perda irreversível da capacidade espermatogênica (RUSSELL et al., 1990).

As espermatogônias caracterizam-se por ter alta taxa mitótica, e conseqüentemente, serem mais susceptíveis aos efeitos de substâncias que alteram a espermatogênese. Em ratos, estas espermatogônias podem dividir até nove vezes numa semana (RUSSELL et al., 1990). Comparada com outros sistemas conhecidos de auto-renovação do corpo, a espermatogênese é considerada como um dos que apresenta maior número de divisões celulares durante o seu desenvolvimento.

Espermatogênese em teleósteos

Nos teleósteos, a espermatogênese desenvolve-se basicamente nas fases descritas anteriormente, mas com algumas particularidades no arranjo tecidual e celular características que, entre outras, conferem maior eficiência ao processo espermatogênico. Este processo em teleósteos pode ocorrer de duas maneiras, conforme a distribuição das espermatogônias ao longo do túbulo seminífero: tipo espermatogonial irrestrito (lobular), no qual as espermatogônias estão distribuídas ao longo do túbulo, e tipo espermatogonial restrito (tubular), com as espermatogônias restritas à porção distal do túbulo seminífero, próximas da albugínea testicular (GRIER et al, 1980; GRIER, 1981; BILLARD 1990). Aparentemente, a tilápia nilótica apresenta arranjo peculiar quanto à distribuição dos cistos de espermatogônias, ocupando posição intermediária entre os tipos espermatogonial restrito e irrestrito, (SILVA 1987; VILELA, 2003) nesta espécie a maior parte das espermatogônias primárias se encontram restritas à porção distal do túbulo seminífero, podem ser observadas também ao longo do túbulo.

Diferente dos mamíferos, nos peixes estudados, a espermatogênese ocorre em espermatocistos que se formam quando células de Sertoli e uma espermatogônia primária se associam. Durante este processo, a espermatogônia primária é circundada por células de Sertoli, que neste estágio são pouco desenvolvidas, e normalmente apresentam núcleo grande e nucléolo proeminente (PUDNEY, 1995; MIURA, 1999; MATTA, 2000; KOULIS et al., 2002; SCHULZ e MIURA, 2002; VILELA, 2003).

O processo espermatogênico de teleósteos assemelha-se ao de outros vertebrados. Durante a fase proliferativa ou espermatogonial, a espermatogônia primária ou tipo A se divide e origina espermatogônias G2 que, depois de um número espécie-específico de divisões mitóticas, diferenciam-se em espermatócitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária. Estas células entram em divisão meiótica formando os espermatócitos secundários, que por sua vez passam pela segunda divisão meiótica para produzir células haplóides, as espermatídes. Em seguida, ocorre a fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual as espermatídes sofrem uma série de alterações morfológicas marcantes, principalmente relacionadas com a condensação nuclear e a formação da peça intermediária e flagelo, originando os espermatozóides, que são células altamente especializadas e equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (MIURA, 1999; MATTA, 2000). Durante a espermição, as células de Sertoli que formam a parede dos cistos se rompem para liberar os espermatozóides num lume

cujo espaço aumenta gradualmente ao longo do período reprodutivo (GRIER et al., 1980; GRIER, 1981; SILVA, 1987; PUDNEY, 1995).

As espermatogônias primárias são as maiores células germinativas na maioria das espécies de teleósteos, apresentando um núcleo grande e claro, com pouca heterocromatina, contendo um ou dois nucléolos bastante evidentes (MIURA, 1999; MATTA, 2000). Em tilápia nilótica, estas células apresentam um diâmetro nuclear médio de 9µm (MATTA, 2000) a 10µm (VILELA, 2003). Após sucessivas divisões, a partir da espermatogônia primária, o número de espermatogônias secundárias por cisto aumenta geometricamente, enquanto o diâmetro nuclear das mesmas sofre gradual redução (SILVA e GODINHO, 1983; VILELA et al., 2003). Os dados disponíveis na literatura mostram que o número de gerações espermatogoniais em teleósteos varia de 4-6 no paulistinha (*Brachydanio rerio*; EWING, 1972) a 14 no guppy (*Poecilia reticulata*; BILLARD, 1969). Valores intermediários para o número de gerações de espermatogônias são observados em outras espécies de teleósteos (LE GAC e LOIR, 1999; MIURA, 1999). Em tilápias-nilóticas, a partir do número de células por cisto e do diâmetro nuclear/volume celular, foi verificada a existência de pelo menos oito gerações espermatogoniais, sendo uma geração de espermatogônia primária e sete diferentes gerações de espermatogônias secundárias (MATTA, et al., 2002; VILELA, et al., 2003; SCHULZ, et al., 2005).

A medida que o volume do espermatocisto aumenta, as células de Sertoli sofrem divisão. Essa atividade mitótica é bastante reduzida em cistos meióticos e ausente em cistos pós-meióticos. A proliferação das células de Sertoli é considerada o fator primário responsável pelo aumento do testículo e da produção espermática observado nos teleósteos. Em condições naturais, a proliferação das células de Sertoli no testículo de mamíferos adultos não é observada (FRANÇA et al., 2002; SCHULZ et al., 2005).

OBJETIVOS

Objetivo geral

Estudar os efeitos do inseticida organoclorado Thiodan[®] nas características morfológicas de testículos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sexualmente imatura, após exposição aguda a esse agrotóxico.

Objetivos específicos

Descrever os testículos de tilápias nilóticas sexualmente imaturas em microscopia de luz, caracterizando morfológicamente esses órgãos para animais com 45 dias de vida, e com diferentes graus de desenvolvimento gonadal; e

Comparar a estrutura dos testículos de animais mantidos como controle com aqueles submetidos à ação do Thiodan[®] durante exposição aguda por um período de 96 horas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ASTDR), 2000. Toxicological profile for endosulfan. Atlanta, GA Disponível em: < <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp41.html> > Acessado em dez. 2006.
- BAYER. Disponível em: < <http://www.bayercropsciencecom.au/products/product.asp?id=116> > Acessado em dez. 2006.
- BEAMISH, F. W. H. Influence of temperature and salinity acclimation on temperature preference of the euryhaline fish Nile tilapia. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, 27:1209-1241, 1970.
- BILLARD, R. Spermatogenenèse de *Poecilia reticulata*: estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Bioch Biophys*, 9:251-271, 1969. In: LACERDA, S.M.S.N.; BATLOUNI, S.R.; SILVA, S.B.G.; HOMEM, C.S.P.; FRANÇA, L.R. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. **Animal Reproduction**, 3:146-159, 2006.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**, 26:877-920, 1986.
- BILLARD, R. Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming Ge. (ed). **Reproduction in the male**. London:Churchill Livingstone 2:183-212, 1990.
- BLOOMQUIST, J. R. Ion channel as targets for insecticides. **Annuals Reviews Entomology**, 41: 163-190, 1996.
- BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 30:1391-1396, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. **Pesticidas: métodos de análise e informações técnicas**. Curitiba: Universidade Federal de Paraná, v.1. 1988.
- BROWN, S. S.; GASTON G. R.; RAKOCINSKI, C. F.; HERAD, R. W. Effects of sediment contaminants and environmental gradients on macrobenthic community trophic structure in gulf of Mexico estuaries. **Estuaries**, 23:411-484, 2000.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: < http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ECO_HELP.htm - 30k > Help Informações Ecotoxicológicas. Acessado em outubro 2006.
- COUTINHO, C. F. B. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, 15:1-56, 2005.
- CAPKIN, E.; ALTINOK, I.; KARAHAN, S. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**,

- 64:1793-1800, 2006.
- CENGİZ, E. İ.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquitofish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health**, 36:75-85. 2001.
- DE ROOIJ, D. G.; LOK, D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**, 21:776-798, 2000.
- DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, 208:191-364, 2002.
- DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticides Science**, 8: 651-660, 1977.
- DUTTA, H. M.; MISQUITA, D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 51:149-56, 2006.
- ENGELHARDT, G. T.; SARMENTO, R. 2004, **Comportamento ambiental do thiodan CE (endosulfan) usado no controle químico da broca do fruto do cafeeiro**. (Dissertação, Mestrado), Engenharia Ambiental, Universidade Federal do Espírito Santo. Disponível em: < http://www.seculodiario.com.br/arquivo/2004/marco/23/noticiario/meio_ambiente/arquivo.doc > Acessado em maio 2008.
- ENGLE, C. R. Economics of tilapia aquaculture. In: Tilapia aquaculture in the Americas. Ed. Barry A. Costa-Pierce and James E. Rakocy. **The World Aquaculture Society**, Baton Rouge, Louisiana, 1:229-243, 1997.
- ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Chemistry of plant protection**. Berlin: Spring-Verlag, 6:67-68, 1990.
- EWING, H. H. Spermatogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat. Rec.* 172, p.308, 1972. In: LACERDA, S.M.S.N. Transplante de espermatogônias: a Tilápia-nilótica (*Oreochromis niloticus*) como modelo experimental. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, 2006. 61p. (Dissertação, Mestrado).
- FAO. **Notes on pesticides: endosulfan**. 1989. Disponível em: < <http://www.fao.org/waicenter/faostat/PestResidue/prfe.html> > Acessado em janeiro 2007.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Vision general del sector acuicola nacional**. (2003), Disponível em: < http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_brazil_es#tcND0064 > Acessado em abril 2008.
- FIZTSIMMONS, K. Tilapia: the most important aquaculture species in the 21st century. In: FIZTSIMMONS, K.; J.C. FILHO (eds.). Tilapia aquaculture in the 21st century. **Proceedings from the Fifth International Symposium on Tilapia in Aquaculture**. Rio de Janeiro, Brazil. 2000.

- FLEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. **The Science of Total Environment**, 317:207-233, 2003.
- FRANÇA, L. R.; ROCHA, D. C. M.; MIRANDA, J. R.; DEBELJUK, L. Proliferação de células de Sertoli y función testicular. **Boletín Informativo de la Sociedad Argentina de Andrología**; 11:52-57, 2002.
- FOYLE, T. P. A histological description on gonadal development and sex differentiation in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) for both untreated and oestradiol immersed fry. **Journal of Fish Biology**, 42:699-712, 1993.
- GOEBEL, H.; GORBACH, S.; KNAUF, W.; RIMPAU, R.H.; HÜTTENBACH, H. **Properties, effects, residues, and analytics of the insecticide Endosulfan**. New York: Springer-Verlag, 174 p. 1982.
- GRIER, H. J. Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. **American Zoologist**, 21:345-357, 1980.
- 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**, 159:331-345, 1981.
- HINTON, D. E.; LAURÉN, D. J. Interactive histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S. M. **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8, 1990.
- 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.
- LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KROBIL, E. NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press. 3:20-30. 1999.
- 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*)**. UFMG. Belo Horizonte, 2000. 108p. (Tese, doutorado em Ciências Biológicas).
- MIURA, T. Spermatogenic cycle in fish. In: KROBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of reproduction**. San Diego: Academic Press, 4:571-578, 1999.
- MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish**. 3ed. Boca Raton: CRC Press, 1:178p. 1988.
- MUSANHI, R. G. Influence of two organochloridepesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United Nations development program food and agriculture organization of the united nations. (FAO). Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research.1987.
- NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHAN, X. et al. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, 281:361-372, 1998.

- NAGAHAMA, Y. The functional morphology of teleost gonads. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D. J., DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology and Reproduction Part. A.**, New York: Academic Press, 9:223-275, 1983.
- NAQVI, S. M.; VAISHNAVI, C. Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 105:347-361, 1993.
- PINHEIRO, S., NARS, N. Y., LUZ, D. Agricultura Ecológica e a Máfia dos Agrotóxicos no Brasil. Rio de Janeiro: Edição dos Autores, 1998. In: AZEVEDO, A. Análise dos impactos ambientais da atividade agropecuária no cerrado e suas inter-relações com os recursos hídricos na região do pantanal. Disponível em: < assets.wwf.org.br/ > Acessado em dezembro 2006.
- PUDNEY, J. Spermatogenesis in non mammalian vertebrates. **Microscopy Research and Techniques**. 6:459-497, 1995.
- PULLIN, R. Cichlids in aquaculture. In: **Cichlides fishes: behaviour, ecology and evolution**. Ed. M. Keenleyside, Chapman and Hall, London, p.20-309, 1991.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina, PR: Grafmarke, 591p. 2005.
- ROSA, A. V. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo: Ed.Atual, p.10-17, 52-63. 1998.
- RÜEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; ALMEIDA, W. F. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, G. & GARCIA, R. C. (Eds.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed.Caetés, p.171-207. 1987.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN R. A.; SHINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. **Histological and histopatological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press. 1:4-20, 1990.
- SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A. et al. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, 22:323-330, 2004.
- SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, 26:43-56, 2002.
- SCHULZ, W. R.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D. A.; GODINHO, H. P. Sertoli Cell Proliferation in the Adult Testis - Evidence from Two Fish Species Belonging to Different Orders. **Biology Reproduction**, 73:891-898, 2005.
- SILVA, M. **Morfologia ultraestrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemo-testicular da Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Peixe Ciclídeo)**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1987. 164 p.

- (Tese, doutorado em Morfologia).
- SILVA, M.; GODINHO, H. P. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Sarotherodon niloticus*. **Archives of Anatomy and Microscopy**, 72:231-237, 1983.
- SINGH, S.K.; PANDEY, R.S. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, 28:953-956, 1990.
- SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 19:1117 – 1127, 2003.
- STICKNEY, R. R. Tilapia nutrition, feeds and feeding. In: **Tilapia aquaculture in the Americas**. Ed. Barry A. Costa Pierce and James E. Rakocy. The World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 1:34-54, 1997.
- STICKNEY R. R. Tilapia Culture. In: Stickney, R.R. (ed.). **Encyclopedia of Aquaculture**, New York: John Wiley & Sons, p.934-941, 2000.
- STUMPF, K.; ABHAVER, J. **An up-to-date review of the environmental chemistry of Endosulfan**. Frankfurt: HOECHST, 23:81/86, 1986. In:
- TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Instituto Biológico. **O Biológico**, São Paulo, 64:135-142, 2002. Disponível em <<http://www.geocities.com/~esabio/tomita.htm>> Acessado em junho 2008.
- TORRANS, L. **Blue tilapia culture in Arkansas**. Pine Bluff: Cooperative Extension Service Program Publication University of Arkansas, 1998.
- TREWAVAS, E. **Fishes of the genera Sarotherodon, Oreochromis and Danakilia**. British Museum of Natural History, London, 1983.
- VASCONCELLOS, M. G., VERANI, N. F. (2000), **Avaliação dos efeitos toxicológicos crônicos do herbicida Roundup (Glifosato) sobre a diferenciação gonadal do Bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840)**, (Dissertação, Mestrado) Disponível em: <http://www.fafibe.br/revistaonline/arquivos/cienciasbiologicas/022-odila-herbicida_roundup.pdf>. Acessado em outubro 2006.
- VILELA, D. A. R. **Evolução do processo espermatogênico e investigação da proliferação das células de Sertoli e da duração das fases meiótica e espermiogênica da espermatogênese sob diferentes temperaturas, em tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*)**. Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, 2003. 74p. (Dissertação, Mestrado).
- VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, 28:187-190, 2003.

WARE, G. W. **An introduction to insecticides**. 4rd ed. University of Minnesota; 2004 [cited 2003 Nov 03]. Disponível em <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm>> Acessado em junho 2008.

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.

CAPÍTULO II

Morfologia testicular de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sexualmente imatura.

Resumo

Realizou-se um estudo descritivo da estrutura do testículo de tilápia nilótica (*O. niloticus*), var. tailandesa. O experimento foi conduzido em condições laboratoriais com o objetivo de manter o controle de variáveis como temperatura da água, fotoperíodo e alimentação, fatores fundamentais no início do ciclo sexual dos teleósteos. Foram estudados os testículos de tilápias nilóticas sexualmente imaturas mantidas em aquários de vidro com capacidade para 50L de água, livre de cloro, com temperatura média de $25,8 \pm 0,62^{\circ}\text{C}$, numa densidade de 1g, de peixe/L de água. Os peixes foram alimentados quatro vezes ao dia com ração comercial contendo 32% de proteína bruta (PB), em taxas de 8-10 % da biomassa/dia. As análises histológicas mostraram que o arranjo estrutural do testículo da tilápia nilótica sexualmente imatura é semelhante ao padrão relatado para outros teleósteos estudados; porém, algumas particularidades na etapa do desenvolvimento e no arranjo celular para esta espécie foram evidenciadas desde as primeiras fases do desenvolvimento sexual dos indivíduos. Assim, foi observado que animais com menos de 2,5g de peso corporal (PC) apresentam testículos em processo de diferenciação celular. Peixes com PC entre $3,0 \pm 0,5\text{g}$ encontram-se na fase proliferativa de espermatogênese com grande quantidade de espermatogônias dos tipos G1 e G2 e células de Sertoli em proliferação. Peixes de maior tamanho, com $4,0 \pm 0,5\text{g}$ PC, encontraram-se na fase meiótica da espermatogênese com grande população de espermatogônias G1 e G2, além de espermatocistos contendo espermatócitos primários e secundários, células de Sertoli e de Leydig diferenciadas. Esses testículos apresentaram área nitidamente aumentada em relação aos peixes de menor tamanho. O presente estudo mostra como animais da mesma idade podem apresentar variações no grau de desenvolvimento gonadal e no momento de início do ciclo espermatogênico.

Palavras-chave: Teleósteos, tilápia nilótica, morfologia testicular, gônadas, células germinativas.

Testicular morphology of the sexually immature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Abstract

This work guided a descriptive study of the testis structure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), Thai variety. The experiment was conducted in laboratory conditions in order to keep control of variables such as water temperature, food and photoperiod, important factors at the beginning of the teleosts sexual cycle. Testis of sexually immature Nile tilapia were studied. The specimens were kept in glass aquariums with a 50L capacity of chlorine free water, with average temperature of $25.8 \pm 0.62^{\circ}\text{C}$, in a density of 1g.fish/L. The fishes were fed 4 times a day, at rates of 8 to 10% of biomass per day with a commercial fish food (32% BP). The histological analysis showed that the structural arrangement of the sexually immature Nile tilapia testis, is similar to the pattern reported for other teleosts studies; however, some peculiarities in the development stage and the cell arrangement for this species were evidenced from the earliest stages of sexual development. Therefore, it was observed that animals with less than 2,5g of body weight (BW), display testis in a cell differentiation process. Fish with $3,0 \pm 0,5\text{g}$ BW, were at the proliferative spermatogenesis phase with large amount of primary spermatogonia (G1), secondary spermatogonia (G2) and Sertoli cells in proliferation. The fish with the largest size, $4,0 \pm 0,5\text{g}$ BW, were all in the meiotic phase of spermatogenesis with large population of G1 and G2 spermatogonia, as well as spermatocysts containing primary (E1) and secondary (E2) spermatocytes, and differentiated Sertoli and Leydig cells. These testes showed noticeably increased area in relation to the smaller fishes. The present study shows that variations on the gonadal development level and the starting moment of the spermatogenic cycle, are possible on animals the same age.

Keywords: Teleosts, Nile tilapia, testicular morphology, gonads, germ cells.

Introdução

A tilápia nilótica é originária da bacia do rio Nilo e, devido a seu potencial para aqüicultura, teve sua distribuição expandida nos últimos cinquenta anos (LOVSHIN, 1997). Trata-se de um peixe teleósteo de águas quentes que por suas poucas exigências respiratórias, crescimento rápido, facilidade para a desova e alta viabilidade das suas larvas, tem sido intensamente utilizado na piscicultura mundial e está hoje entre as espécies mais indicadas para o cultivo intensivo em regiões tropicais (FAO, 2003). Esta espécie apresenta ótimas qualidades para a piscicultura, além de estar presente em inúmeros ecossistemas naturais (rios e riachos). Inclusive em países onde é considerada uma espécie exótica, ela alcança grandes populações, o que evidencia a sua grande capacidade de adaptação. Estando já catalogada como uma das espécies mais promissoras na produção piscícola dos países em desenvolvimento, se faz importante o estudo detalhado da biologia reprodutiva desta espécie, desde suas primeiras etapas de vida. Neste sentido, é importante o conhecimento detalhado do momento no qual inicia o processo espermatogênico nos animais jovens, com a finalidade de compreender melhor o comportamento reprodutivo desta espécie e reconhecer os momentos mais vulneráveis nas diferentes etapas do seu ciclo sexual. O presente estudo descreve a estrutura do testículo nas fases iniciais do desenvolvimento gonadal na tilápia nilótica.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). O processamento das amostras foi feito no Setor de Morfologia do DVT. A microtomia, coloração e montagem das lâminas, assim como as análises histológicas e morfométricas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

Animais

Todos os procedimentos que envolveram uso de animais na pesquisa seguiram as “Normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do

DVT/UFV” (Protocolo n. 74/2007). Foram estudados os testículos de 12 exemplares machos de tilápia nilótica (*O. niloticus*) variedade tailandesa, sexualmente imaturos, com 45 dias de idade, peso corporal de $3,1 \pm 1,2$ g, e comprimento-padrão de $4,37 \pm 0,5$ cm, obtidos na Piscicultura da Prata, na cidade de Eugenópolis, Minas Gerais. Os peixes foram agrupados em faixas de tamanho e peso para análises histológicas em cada categoria de tamanho estabelecida.

Todos os peixes utilizados no presente trabalho tinham 45 dias de vida, mas apresentaram diferenças marcantes no grau de desenvolvimento do processo espermatogênico. Com base nisso, os peixes foram divididos em três grupos tendo em vista o peso corporal e o comprimento-padrão, visando um estudo detalhado das características funcionais e estruturais de testículos em diferentes fases.

Condições laboratoriais

Os peixes com 30 dias de idade foram mantidos durante 15 dias em aquários de vidro com capacidade de 50 litros, numa densidade de 1g de peixe por litro de água. Foi utilizada água livre de cloro, com temperatura controlada em $26 \pm 1^\circ\text{C}$ e monitorada duas vezes ao dia. Todos os aquários contaram com sistema de filtração (250L/h) e aeração contínua da água para garantir o bem-estar dos animais. Ao longo do período experimental foram determinados parâmetros físico-químicos da água (pH, temperatura, dureza total, oxigênio dissolvido, condutividade elétrica, amônia total e tóxica), análises realizadas na Divisão de Água e Esgoto da UFV. O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro, controlado por “*timer*”. Os peixes foram alimentados com ração comercial (32% proteína bruta) na razão de 8-10% da biomassa/dia, fornecida 4 vezes ao dia (às 8, 11, 14 e 17 h). Os aquários foram sifonados uma vez ao dia para eliminar restos de matéria orgânica, e no mesmo momento, era feita a substituição de 25% da água de cada aquário por água limpa e livre de cloro, para garantir a boa qualidade do ambiente.

Obtenção de dados biométricos

Para obtenção de dados biométricos e coleta de gônadas os peixes foram coletados e transferidos para solução aquosa de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento de anestesia até eutanásia, após o que se registraram o comprimento-

padrão (CP) desde o focinho até o pedúnculo caudal, e o peso corporal (PC). O comprimento, em centímetros, foi obtido com auxílio de paquímetro, e o peso corporal, em gramas, determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g.

Coleta das gônadas e microscopia de luz

Após incisão longitudinal ventral da parede celomática, os testículos foram removidos, seccionados transversalmente no terço médio e imediatamente fixados em líquido de Bouin. O material foi fixado por um período de 24 horas e depois preservado em etanol 70%. Os fragmentos de testículo foram transferidos para etanol 90% por 4 horas. A seguir foram mantidos numa solução álcool: resina 1:1 por 12 horas, transferidos posteriormente para resina pura por 24 horas, e finalmente incluídos em glicol-metacrilato (Historesin®/Leica).

Foram obtidos cortes seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Reichert-Jung) utilizando navalha de vidro, sendo submetidos à coloração com hematoxilina-eosina de Harris ou com azul de toluidina em borato de sódio (1%), para posterior análise morfológica. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de luz Olympus CX40. 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 o software Adobe Photoshop CS2®.

Análises morfológicas

A contagem de espermatogônias primárias e secundárias foi realizada segundo metodologia adotada por MATTA (2000). O número médio de espermatogônias primárias (G₁) e secundárias (G₂) por mm³, foi obtido por meio de contagens de células nos cortes seriados, realizadas em 10 cortes histológicos por cada peixe. Para isso, foram obtidas quatro lâminas para cada animal. Em cada uma delas, foram colocados doze cortes. Em função de valores já pré-determinados para o tamanho das mesmas, a contagem foi conduzida em um a cada cinco cortes. As proporções volumétricas foram feitas segundo as seguintes fórmulas:

Volume testicular analisado, em mm^3 = Volume de contagem celular

$$\text{Volume, em } \text{mm}^3 = (\text{Área testicular, em } \text{mm}^2) * (\text{Comprimento, em } \text{mm})$$

Onde a área testicular pertence à área do terço médio do testículo em corte transversal, e o comprimento se refere ao comprimento do testículo que foi analisado nas contagens.

Número de células germinativas/ mm^3 = Quantidade espermatogônias G1 em mm^3

$$G_1 \text{ por } \text{mm}^3 = \frac{\text{Células G1}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{n. de Células G1}}{\text{Volume}}$$

Número de células germinativas/ mm^3 = Quantidade espermatogônias G2 em mm^3

$$G_2 \text{ por } \text{mm}^3 = \frac{\text{Células G2}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{n. de Células G2}}{\text{Volume}}$$

Por cada peixes realizou-se também a medição do diâmetro de 10 núcleos de G1 e 10 núcleos de G2 escolhidos ao acaso (células arredondadas com nucléolo evidente), utilizando régua micrométrica e aumento de 1000X. A partir desses valores, foi conduzida análise estatística dos dados para determinar se existe diferença significativa no diâmetro nuclear entre os três grupos estudados.

A área testicular, em μm^2 , foi calculada por meio de software Image-Pro Plus, especializado para esse fim, a partir de imagens digitais de cortes transversais do terço médio dos testículos obtidas em fotomicroscópio Olympus AX70 TRF.

Análises estatísticas

Todos os valores registrados para os diferentes parâmetros investigados foram expressos como média \pm desvio-padrão ($M \pm DP$). As variáveis quantitativas obtidas nos estudos dos diferentes grupos foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade (Cochran e Bartlett). Posteriormente foram submetidos a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de Duncan (SAEG, 1999). O nível de

significância considerado foi de $p < 0,05$.

Resultados e discussão

Qualidade da água

Mesmo a tilápia nilótica sendo uma espécie resistente, inclusive em ambientes mais hostis, a qualidade da água é fundamental para o bom desenvolvimento dos indivíduos. Na prática laboratorial, o monitoramento da água se faz muito mais importante visto que peixes em confinamento não têm a possibilidade de procurar melhores locais (ANDRADE, 2005). Durante o período experimental, a água dos aquários apresentou características físicas e químicas dentro dos limites considerados aceitáveis para a espécie. A Tabela 1 mostra os valores obtidos para as diferentes variáveis físico-químicas da água durante o período em que os peixes foram mantidos no laboratório para posterior estudo.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade físico-química da água.

<i>Variável</i>	<i>M ± DP</i>
pH	7,0 ± 0,09
Temperatura (°C)	25,8 ± 0,62
Amônia total (mg/L)	2,07 ± 1,00
Amônia não ionizada (mg/L)	0,012 ± 0,001
Dureza total (mg CaCO ₃ /L)	58,12 ± 23,81
Oxigênio dissolvido (mg/L)	6,76 ± 0,76
Condutividade elétrica (μ.S/cm)	96,44 ± 17,20

Média ± Desvio-padrão.

Na maioria das espécies de teleósteos, os ciclos reprodutivos ocorrem em função de variações das condições ambientais, sendo a temperatura e o fotoperíodo considerados como os dois mais potentes moduladores da atividade reprodutiva (BILLARD, 1986; BORG, 1994; SHIMIZU, 2003). As variáveis mensuradas se mantiveram dentro das faixas ideais para o desenvolvimento adequado de peixes tropicais. No que tange à temperatura, existe uma faixa térmica ideal para cada espécie, sendo que para as espécies de peixes tropicais varia entre 24 a 32°C. A temperatura ideal para o desenvolvimento da tilápia nilótica situa-se entre 26 e 32°C (KUBITZA, 2000).

Embora a tilápia consiga viver em pH entre 5 e 11 (WATANABE et al., 2002), o recomendado para peixes tropicais encontra-se entre 7 e 8, visto que valores

inadequados podem prejudicar o desempenho dos peixes (SALARO et al., 2006). Embora a tilápia tolere altos níveis de amônia não ionizada (2,4-3,4 mg/L), para ARANA (1997) e KUBITZA (1999), níveis de amônia entre 0,15 e 1,0 mg/L podem levar à diminuição do crescimento dos peixes, enquanto exposições contínuas ou freqüentes a 0,2mg/L podem ser prejudiciais para os animais. O tamanho dos espécimes tem grande influência no nível de toxicidade, pois peixes menores recebem maior dosagem por unidade de peso do que peixes maiores, sendo então mais suscetíveis à toxicidade da amônia não ionizada. Os teores médios de amônia não ionizada encontrados no presente experimento ($0,012 \pm 0,001$ mg/L) não apresentaram qualquer risco de toxicidade para os animais por encontrarem-se dentro dos níveis de tolerância estabelecidos para essa espécie.

O bom crescimento dos peixes ocorre quando os níveis de oxigênio situam-se entre 5 e 6 mg/L. Para WATANABE et al. (2002), a tilápia nilótica tolera baixos níveis de oxigênio dissolvido na água (1,0 ppm ou mg/L). Porém, tem sido demonstrado que valores menores que 5 mg/L podem causar diminuição no ganho de peso, e valores menores que 1mg/L durante períodos prolongados podem ser letais para algumas espécies de peixes (KUBITZA, 1999; OSTRENSKY e BOEGER, 1998).

Valores encontrados para dureza total estiveram dentro dos limites de tolerância estabelecidos para o cultivo de peixes de água doce, conforme proposto por KUBITZA (1999) e OSTRENSKY e BOEGER (1998), quando advertem que esta variável não deve estar abaixo de 20mg/L. Para SWANN (2008), valores de dureza total maiores que 20mg/L devem ser mantidos para um ótimo crescimento de organismos aquáticos e relata valores de dureza total aceitáveis entre 20-400mg/L.

Para SIPAÚBA-TAVARES e MORENO (1994), há um padrão de flutuação da condutividade em viveiros de piscicultura de água doce. No período de seca e período de chuva varia entre 40 μ S/cm a 120 μ S/cm, com os maiores valores, obtidos no período de seca. Os valores médios de condutividade elétrica do presente estudo ($96,44 \pm 17,20$ μ S/cm) se mantiveram dentro dos parâmetros geralmente registrados nas pisciculturas.

Dados biométricos

A Tabela 2 mostra os valores médios para os dados biométricos dos grupos de peixes estudados. Observa-se que no grupo I encontram-se os peixes de menor peso e

tamanho, menores que 2,5g PC, entre 3-3,99cm de CP; no grupo II, os peixes de tamanho médio, entre 2,5-3,99g de PC, e 4-4,79cm de CP; e no grupo III, os peixes de maior tamanho, com 4-5,99g de PC, e 4,80-5,50cm de CP.

Tabela 2. Peso corporal (PC) em g, e comprimento-padrão (CP) em cm, de machos de tilápia nilótica sexualmente imaturos.

<i>Grupo</i>	<i>n.</i>	<i>PC</i> <i>M ± DP</i>	<i>CP</i> <i>M ± DP</i>
I	4	1,89 ± 0,06 a	3,73 ± 0,06 a
II	4	2,73 ± 0,28 b	4,28 ± 0,28 b
III	4	4,71 ± 0,62 c	5,07 ± 0,10 c

M: média; DP: desvio-padrão; n: número de peixes. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os dados biométricos dos animais mostraram diferenças significativas nas variáveis de peso e comprimento padrão, mostrando que embora os animais sejam da mesma idade apresentam tamanhos diferentes, sugerindo também fases de desenvolvimento gonadal diferentes.

Morfologia dos testículos

A tilápia nilótica jovem apresenta testículos pares, localizados dorsalmente na cavidade celomática e nela fixados pelo mesórquio. Os testículos em peixes jovens são alongados, de superfície lisa e apresentam tamanho semelhante entre o direito e o esquerdo, concordando com características descritas por SILVA e GODINHO (1983) para tilápia, e também para outros teleosteos estudados (LE GAC e LOIR, 1999). Nas primeiras etapas de seu desenvolvimento, os testículos de tilápia nilótica têm forma semelhante a uma fita com a extremidade cranial afilada, apresentando-se transparentes ou acinzentados, e ocupando pouco volume na cavidade celômica. Em estádios mais avançados de desenvolvimento, seu diâmetro começa a aumentar principalmente no terço médio do órgão que se torna triangular, a porção caudal se afila gradualmente até unir-se à do outro testículo, nesse estágio, a gônada vai se tornando mais esbranquiçada, como observado em peixes adultos (SILVA, 1987).

Histologicamente, os testículos de jovens de tilápia nilótica apresentam

características similares às de outros teleósteos em fases de desenvolvimento gonadal mostrando uma organização geralmente tubular seminífera cística o que equivale a dizer que, em vez de existir um sistema tubular padronizado e revestido por epitélio seminífero contínuo e constante, como observado em mamíferos (CLERMONT, et al., 1972, 1991; RUSSELL, et al., 1990;), nos testículos de peixes as células germinativas geralmente se dividem e se diferenciam no interior de cistos germinativos ou espermatocistos, cujas paredes estão constituídas por células de Sertoli, como já descrito por diferentes autores (GRIER, et al, 1980; SILVA e GODINHO, 1983; ALEXANDRINO, et al., 1985; BILLARD, 1986; PUDNEY, 1995; LE GAC, et al, 1999; AIRES, et al, 2000; QUAGIO-GRASSIOTTO et al., 2003., SCHULZ et al., 2005; CHAVES-POZO et al. 2005; PECIO et al., 2007).

Os testículos de tilápia jovem mostram particularidades da espécie que poderão permanecer até o órgão atingir a sua maturidade e fornecer ao indivíduo a capacidade de realizar seu papel na criação de novas gerações, da mesma forma que constataram SILVA (1987), MATTA (2000) e VILELA (2003) estudando tilápias adultas. Estes autores relatam a presença de células germinativas do tipo G1, tanto na periferia quanto na região central do órgão. A Figura 1 mostra a estrutura geral do testículo de tilápias nilóticas sexualmente imaturas, que ao corte transversal apresentam aspecto triangular ou oval, se encontram ligados à parede celomática pelo mesórquio. Esta estrutura que dá suporte ao testículo se estende desde o peritônio parietal até a gônada, continuando-se sobre a parte externa da mesma como um revestimento ainda pouco desenvolvido, constituído por uma fina camada de epitélio pavimentoso o peritônio visceral (mesotélio).

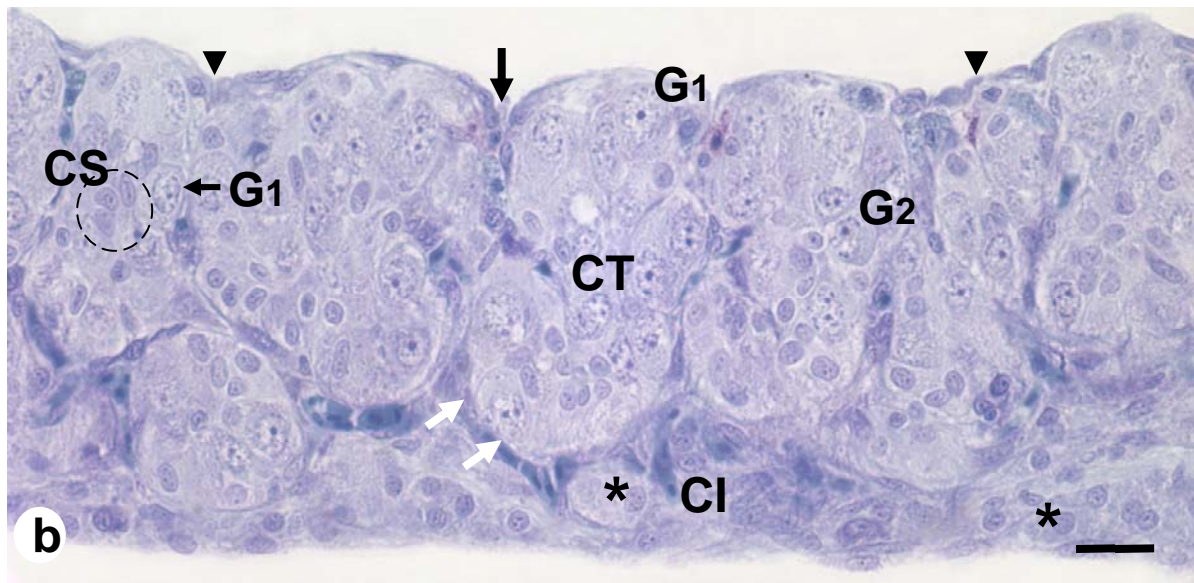
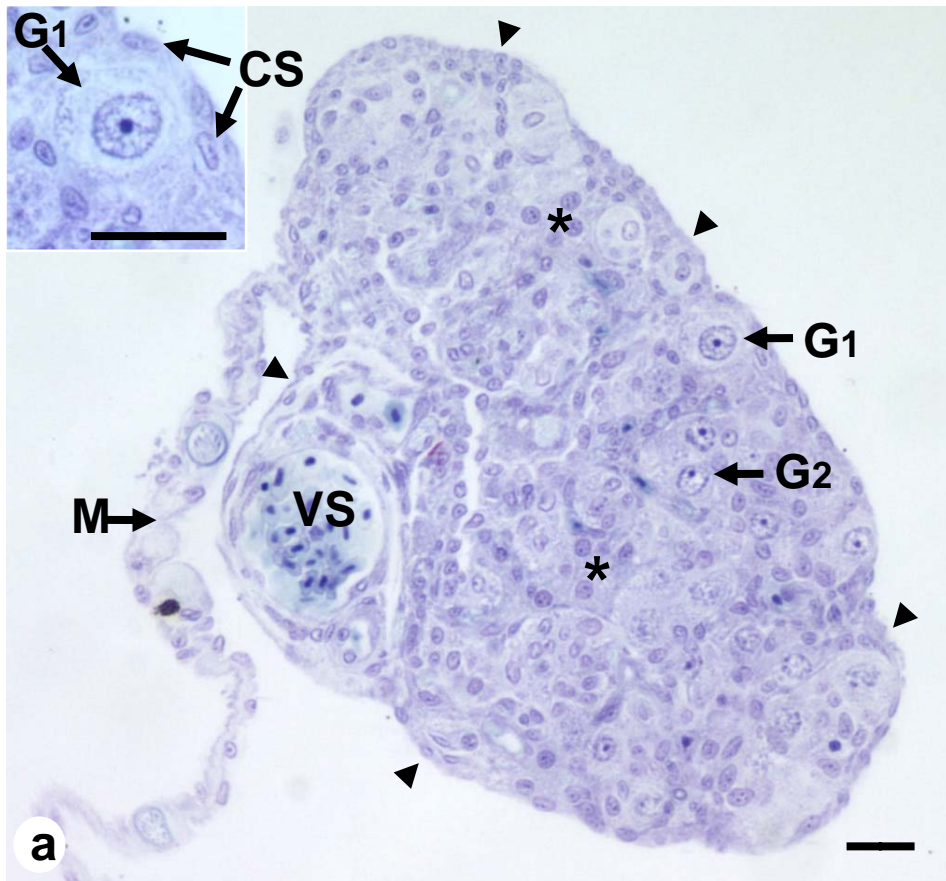


Figura 1. Testículos de tilápia nilótica sexualmente imatura. (a) Corte transversal mostrando estrutura geral e forma triangular. O mesórquio (M) que dá suporte ao testículo se continua sobre o órgão como revestimento externo o mesotélio (▶). Observe vaso sanguíneo (VS), células de Leydig (*), além de cistos de espermatogônias dos tipos G1 e G2. Detalhe: espermatogônia do tipo G1 circundada por células de Sertoli (CS) iniciando a formação de um cisto germinativo. (b), Corte longitudinal mostra a organização estrutural do parênquima testicular de tilápia nilótica em fase proliferativa da espermatogênese, na superfície do órgão o mesotélio ou peritônio visceral (▶) emite septos de tecido conjuntivo (setas preta e branca) partindo da periferia e separando o parênquima testicular em lóbulos. Observa-se no compartimento tubular (CT), espermatocistos contendo espermatogônias G1 e G2 circundados por

células de Sertoli (CS). No compartimento intersticial (CI), células de Leydig já diferenciadas (*) e, na parte inferior, observam-se grande quantidade de células intersticiais indiferenciadas. Coloração: azul de toluidina. Barra: 20µm.

Nos peixes adultos, o revestimento externo testicular é constituído por uma delicada túnica de tecido conjuntivo (mesotélio) que se apresenta espessada na região dorsal do órgão (SILVA, 1987). Esta estrutura é conhecida como túnica albugínea foi evidenciada, no presente experimento, nos peixes em estádios mais avançados do processo espermatogênico. Foi observado que a partir da túnica albugínea, na região periférica do testículo, se originam septos fibrosos que dividem o órgão em lobos testiculares (Figura 1b) como observado nos testículos de tilápias adultas (SILVA, 1987; MATTA, 2000; VILELA, 2003) e em diferentes espécies de peixes teleósteos adultos (GRIER, 1980; BILLARD, 1986; AIRES, 2000). Em geral, o parênquima testicular nos jovens de tilápias nilóticas do presente experimento apresentou compartimento intersticial evidente e início de formação de cistos de espermatogônias observado quando uma espermatogônia G1 se associa a uma ou mais células de Sertoli (CRUZ-HÖFLING e CRUZ-LANDIM, 1984; BILLARD, 1986; SILVA, 1987; ROMAGOSA et al., 2000) (Figura 1a, detalhe). Porém, alguns animais ainda contêm células indiferenciadas ou em fases pouco avançadas de desenvolvimento. Também foi possível evidenciar no presente estudo, o início da formação dos ductos espermáticos ou ductos testiculares. Em etapas iniciais da espermatogênese, ainda não são evidentes os túbulos seminíferos, devido ao pouco desenvolvimento do testículo que só possui cistos espermatogênicos de células dos tipos G1 e G2 isolados no parênquima do órgão.

Desenvolvimento gonadal inicial em tilápia

A análise histológica dos diferentes grupos estabelecidos (Tabela 2) mostrou que no grupo I os peixes caracterizam-se por apresentar o menor diâmetro testicular, além de grande população de células indiferenciadas em um parênquima testicular que, às vezes, ainda não está dividido em compartimentos teciduais e se encontra constituído principalmente de tecido conjuntivo. O arranjo celular mostra aspecto irregular. Em alguns peixes, se observaram poucas espermatogônias-tronco (G1), isoladas ou associadas a uma célula de Sertoli, preferencialmente na periferia do testículo, podendo também ser observadas na região central do parênquima testicular como em animais adultos. Em menor quantidade, encontra-se em alguns peixes, a primeira geração das espermatogônias G2. Apesar das células de Sertoli serem as primeiras células somáticas

a se diferenciarem nos testículos de mamíferos (KARL e CAPEL, 1998), nos peixes do grupo I do presente estudo, uma grande porcentagem ainda encontrava-se indiferenciada ou em processo de diferenciação. Observou-se pouca quantidade de células de Leydig (Figura 2a).

A fase proliferativa da espermatogênese foi evidenciada em todos os peixes do grupo II, onde além de espermatogônias-tronco isoladas (G1), foram observados espermatocistos de G1 e de várias gerações de G2. As células de Sertoli já começam a proliferar com a finalidade de sustentar a população da linhagem espermatogênica, que nesta etapa aumenta gradativamente em quantidade (SILVA 1987; SCHULZ et al., 2005). Neste grupo é bem evidente a diferenciação dos compartimentos testiculares, onde se observam claramente as células de Leydig no compartimento intersticial, o compartimento tubular ocupado por espermatocistos e o início da formação do ducto espermático em alguns peixes (Figura 2b-c).

No grupo III, formado por peixes de maior tamanho e peso, além de várias gerações de G1 e G2, foi observada a fase meiótica da espermatogênese pela presença de cistos de espermatócitos primários e secundários (Figura 3a-b). Em alguns peixes foi observada a presença de túbulos seminíferos com lume reduzido e ductos espermáticos.

A fase espermiogênica, na qual espermátides se diferenciam em espermatozoides, não foi observada em nenhum peixe dos três grupos estudados, uma vez que nenhum deles foi além da fase meiótica do processo espermatogênico nas categorias de tamanho estudadas.

Na literatura, no que tange à biologia da reprodução de teleósteos, vários autores dividem o ciclo reprodutivo com base no grau de desenvolvimento gonadal. Tanto para machos quanto para fêmeas, são descritos os estádios imaturo, em maturação (varia segundo a espécie), maduros e esgotados/desovados (GRIER & TAYLOR 1998; GOMEZ-MARQUEZ et al., 2003; VITULE, 2007). No presente estudo, os peixes de menor tamanho e peso (grupo I), encontraram-se no estágio imaturo, cujos testículos apresentam características macroscópicas como difícil visualização, formato filiforme ou fitáceo; incolores e translúcidos, sendo difícil a determinação exata do sexo nesse estágio. Microscopicamente, contém poucas células germinativas. Os peixes do grupo II encontram-se em estágio de maturação inicial apresentando testículos esbranquiçados, aumentados de volume, com secção transversal ligeiramente triangular. A análise histológica mostrou células da linhagem germinativa como espermatogônias primárias e

secundárias distribuídas de forma organizada constituindo espermatocistos, as células de Sertoli encontram-se em proliferação. No grupo III encontram-se peixes em fase de maturação intermediária com testículos de cor branco apresentando fases proliferativa e meiótica da espermatogênese, com túbulos seminíferos preenchidos de espermatocistos contendo desde espermatogônias primárias até espermatócitos secundários, apresentam lúmen estreito, nestes animais se faz evidente o ducto espermático. Estes aspectos reprodutivos coincidem com o descrito para tilápia por MATTA (2000) e o relatado para outros teleósteos (MENEZES et al., 2000; AMER et al., 2001; BARRETO et al., 2003; VITULE, 2007).

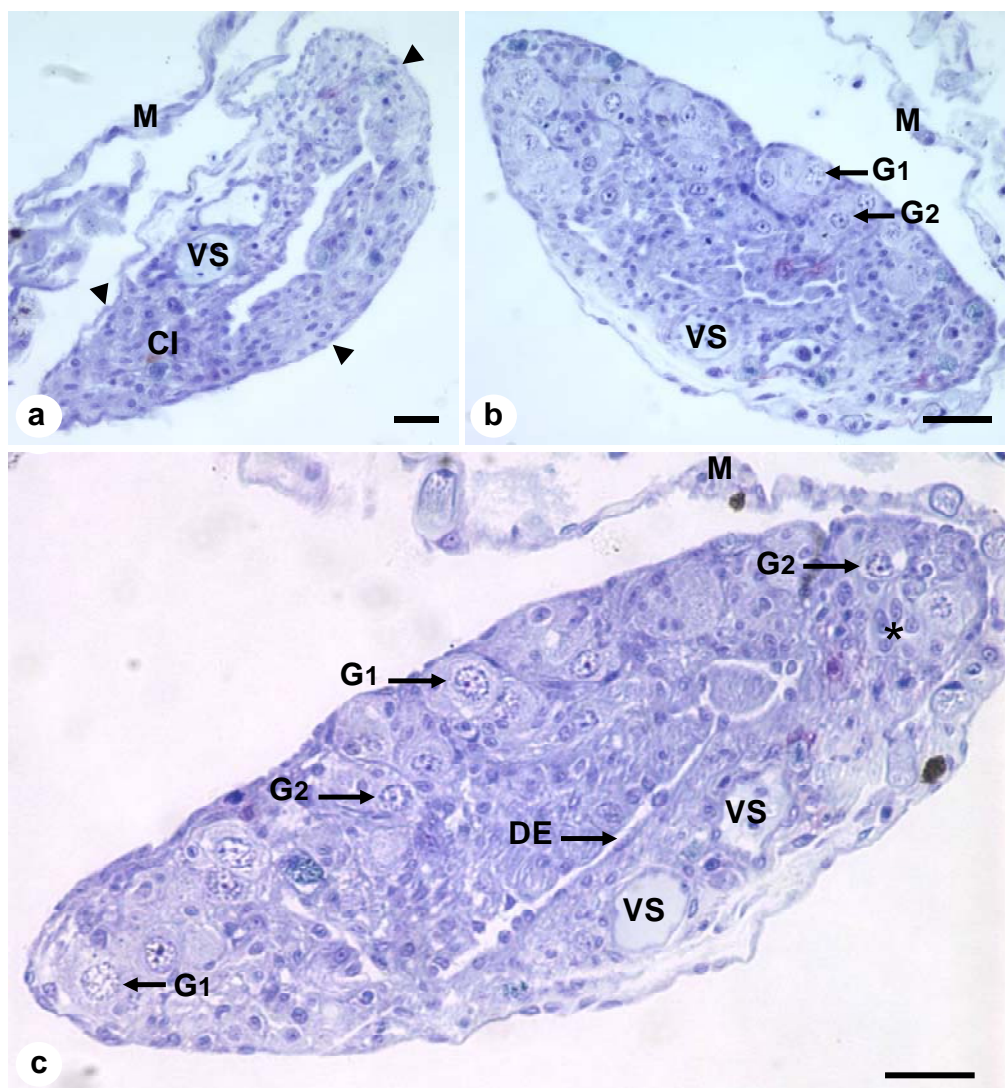


Figura 2. (a) Corte transversal de testículo de tilápia nilótica pertencente ao grupo I, apresentando grande população de células intersticiais imaturas (CI) e um parênquima ainda não compartimentalizado, constituído principalmente por tecido conjuntivo. (b-c) Testículos de peixes do grupo II iniciando a fase proliferativa da espermatogênese, caracterizada pela



presença de cistos de espermatogônias G1 e G2, proliferação das células de Sertoli (*) e formação do ducto espermático (DE). (VS) vaso sanguíneo, (M) mesórquio, () mesotélio. Coloração: azul de toluidina. Barra: 20µm.

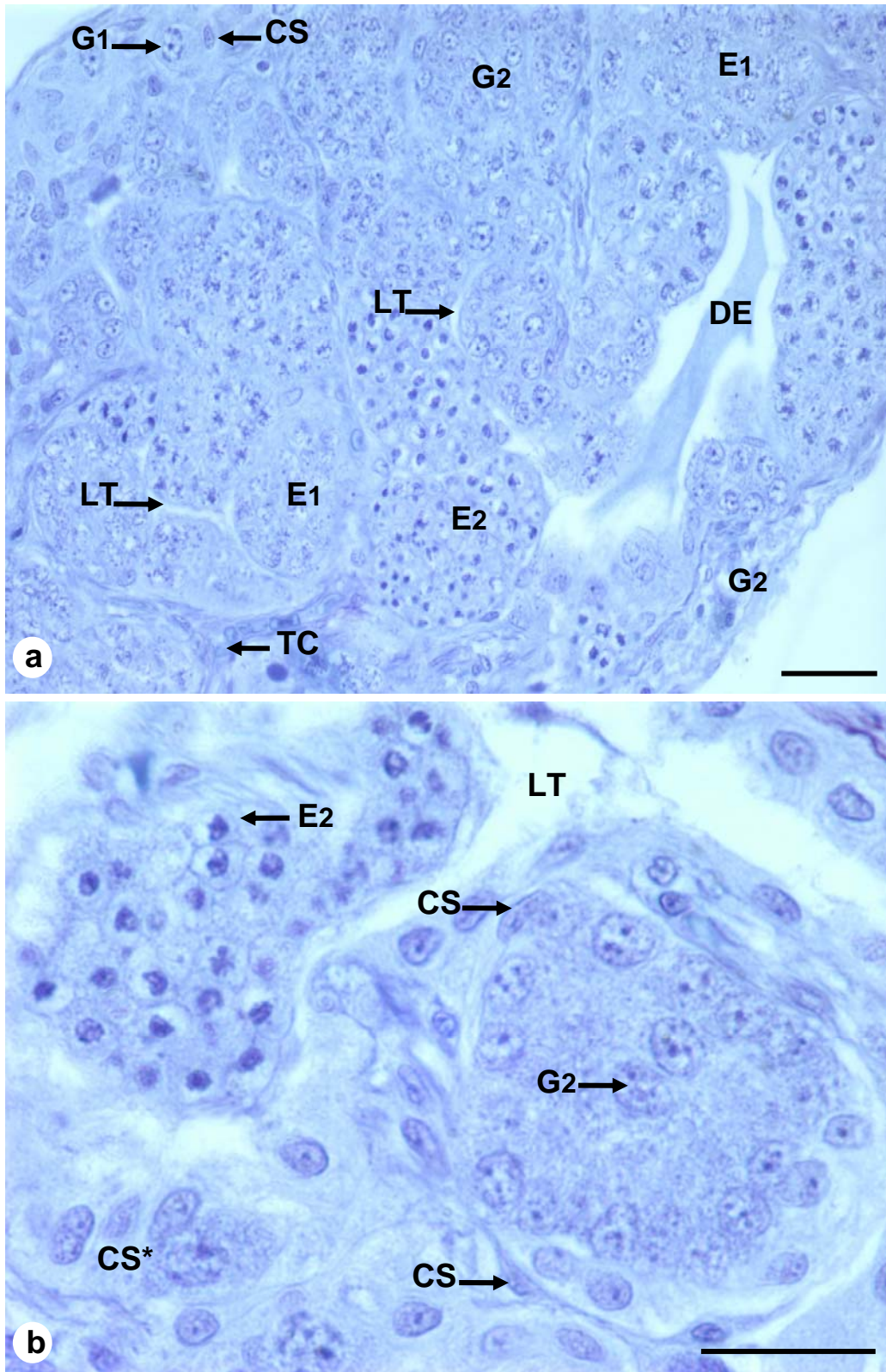


Figura 3. (a-b) Testículos de tilápias nilóticas pertencentes ao grupo III mostrando a fase meiótica da espermatogênese, onde se observam espermatocistos de G2, assim como túbulos seminíferos contendo cistos de espermatócitos primários (E1) e secundários (E2) separados por tecido conjuntivo (TC), e lume (LT) ainda estreito. Células de Sertoli associadas a espermatocistos (CS) ou em proliferação (CS*), ducto espermático (DE). Coloração: azul de

toluidina; Barra: 20 μ m.

Morfometria testicular

A determinação da área testicular a partir do terço médio dos órgãos mostrou aumento gradativo de diâmetro à medida que o processo espermatogênico progride. Na Tabela 3 são apresentados os valores médios da área testicular para cada grupo estudado, além dos diâmetros nucleares das células germinativas G1 e G2.

Tabela 3. Valores médios e desvios-padrão da área testicular (AT), em μm^2 , e diâmetro nuclear (DN) das espermatogônias G1 e G2, em μm , nos diferentes grupos.

<i>Grupo</i>	<i>n</i>	<i>AT</i> <i>M \pm DP</i>	<i>DN G1</i> <i>M \pm DP</i>	<i>DN G2</i> <i>M \pm DP</i>
I	4	18677,0 \pm 1454,1 b	10,33 \pm 0,58 a	7,16 \pm 0,58 a
II	4	28617,4 \pm 10026,7 a	10,84 \pm 1,48 a	7,21 \pm 0,80 a
III	4	32623,1 \pm 9648,24 a	10,20 \pm 0,96 a	7,23 \pm 0,90 a

n: número de peixes; M: média; DP: desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

As análises estatísticas mostraram diferença significativa da área testicular, para os peixes do grupo I quando comparados com os peixes dos grupos II e III, o que indica aumento no diâmetro da gônada devido à proliferação celular decorrente do início do processo espermatogênico. A fase proliferativa da espermatogênese desencadeia uma seqüência de mitoses das espermatogônias G1 e G2 que visam aumentar a população de células germinativas. Além disso, as células de Sertoli também iniciam processo de proliferação com a finalidade de dar suporte à população crescente de células germinativas.

Em tilápias nilóticas, a partir do número de espermatogônias por espermatocisto, foi verificada a existência de pelo menos oito gerações espermatogoniais, sendo uma geração de espermatogônia primária e sete diferentes gerações de espermatogônias secundárias (MATTA, 2000; VILELA, et al., 2003; SCHULZ et al., 2005), sendo que, SILVA (1987) registrou cistos de espermatogônias secundárias contendo até 32 células. Este tipo de proliferação celular gera um rápido e significativo aumento no diâmetro testicular uma vez iniciada a fase proliferativa da espermatogênese. Recentemente,

demonstrou-se em bagre-africano (*Clarias gariepinus*) já adultos que, à medida que o volume dos espermatocistos aumenta, as células de Sertoli sofrem divisão. Essa atividade mitótica é bastante reduzida em cistos meióticos e ausente em cistos pós-meióticos (SCHULZ et al., 2005). A proliferação das células de Sertoli é considerada o fator primário responsável pelo aumento do testículo e da produção espermiática observados nos teleósteos (SILVA e GODINHO, 1989). Em condições naturais, a proliferação das células de Sertoli no testículo de mamíferos adultos não é observada. (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

A mensuração do diâmetro nuclear das células germinativas dos tipos G1 e G2 mostrou que, tanto para as espermatogônias G1 quanto para as G2, a variação no tamanho dos núcleos não foi significativa nos diferentes grupos estudados, o que concorda com resultados relatados por pesquisadores como SILVA (1987), MATTA (2000) e VILELA (2003) ao consentirem que estas células germinativas, assim como as células de Leydig e de Sertoli depois de diferenciadas, mantêm um tamanho uniforme sem interferências da idade, tamanho ou peso do peixe. O valor médio geral de diâmetro nuclear neste estudo para as células do tipo G1 foi de $10,65 \pm 1,3\mu\text{m}$, e para G2 foi de $7,1 \pm 0,8\mu\text{m}$, concordando com os valores encontrados por vários autores, na mesma espécie. Assim, SILVA (1989) relatou que diâmetro nuclear máximo para G1 pode atingir $9,7\mu\text{m}$, e para G2, $7,9\mu\text{m}$, MATTA (2002) estimou diâmetro nuclear de $9,3 \pm 0,3\mu\text{m}$ para G1 e $6,8 \pm 0,2\mu\text{m}$ para G2 e SCHULZ et al. (2005) encontraram diâmetro nuclear médio de $10,1 \pm 0,8\mu\text{m}$ para G1, e diâmetro nuclear máximo para G2, de $7,9\mu\text{m}$. Para MIURA (1999), o diâmetro das espermatogônias primárias pode variar entre 10 e $15\mu\text{m}$.

Proliferação de células germinativas

O estudo quantitativo envolveu contagens de células germinativas (G1 e G2) para determinação das proporções médias da quantidade dessas células por mm^3 . A Figura 4 apresenta as médias dos dados obtidos por grupo. O grupo I apresentou menor quantidade de células germinativas, provavelmente devido ao fato deste grupo ser constituído por peixes de menor tamanho, cujos testículos apresentam poucas células da linhagem espermatogênica G1, e em menor quantidade espermatogônias G2. No grupo II, onde os peixes encontravam-se na fase proliferativa da espermatogênese, observou-

se um incremento significativo na quantidade de G1 e G2/mm³. Estes dados coincidem com o encontrado por MATTA (2002), quando relatou que peixes jovens com até 3,7cm de CT só possuem cistos de G1, enquanto cistos de peixes entre 3,8 e 4,5cm de CT continham células G2. Uma queda na população de G1 foi observada nos peixes do grupo III, os quais se encontravam na fase meiótica da espermatogênese. Em contraste, manteve-se a tendência de aumento da população de G2 nesses peixes, sendo observados também cistos de espermatócitos primários e secundários. MATTA (2002) observou em peixes acima de 4,6cm de CT a presença de cistos de espermatócitos primários, situação observada no presente estudo para peixes acima de 5cm de CP.

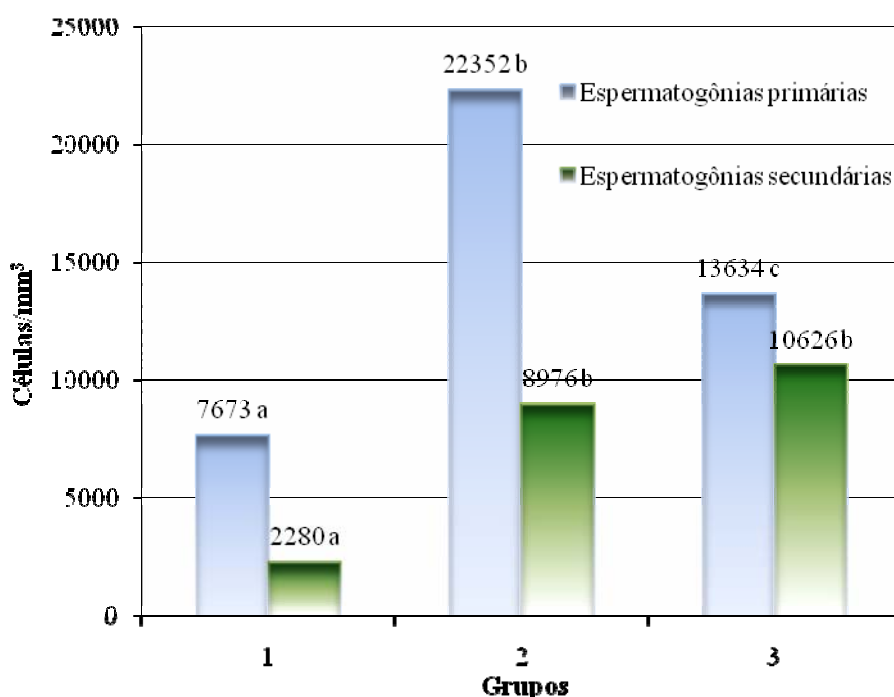


Figura 4. Quantidades médias de células (G1 e G2) por mm³ nos diferentes grupos. Letras diferentes na mesma série indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

A variação das populações de células germinativas nos diferentes grupos obedece, provavelmente, às diferentes etapas da espermatogênese apresentadas em cada faixa de tamanho estudada. Nos peixes do grupo I as espermatogônias primárias encontram-se em processo de diferenciação e sua população é reduzida, sendo encontradas principalmente na periferia do órgão. Por outro lado, na fase proliferativa da espermatogênese (peixes do grupo II), as células germinativas (G1 e G2) entram em processo contínuo de mitose com o fim de aumentar e estabilizar sua população para cumprir o processo espermatogênico originando, no final, os espermatozóides. Neste

grupo foi observado também um aumento importante na população de células do tipo G2, além da proliferação ativa das células de Sertoli, população celular que dá suporte aos cistos de células germinativas e que desempenham um importante papel na capacidade espermatogênica do testículo tanto em teleósteos (SILVA & GODINHO, 1989; SCHULZ et al., 2005), quanto em mamíferos (RUSSELL et al., 1990).

Na fase meiótica da espermatogênese (peixes do grupo III), as células G1 tendem a se estabilizar após o período de proliferação, o que provavelmente explica a diminuição observada para este tipo celular, quando comparado com o grupo II. Ao mesmo tempo, se observa um leve aumento da população de G2, células da linhagem espermatogênica que originarão os espermátocitos primários, e que também foram observados nos peixes pertencentes a este grupo.

Nos peixes, as fases iniciais da espermatogênese que incluem as etapas de mitose e meiose, apresentam variações limitadas entre espécies. Isto contrasta fortemente com a fase mais adiantada de espermiogênese, quando espermátides se diferenciam em espermatozóides que são adaptados à fecundação em função do modo particular de reprodução de uma determinada espécie (PECIO et al., 2007).

Conclusões

Embora os peixes jovens encontrem-se numa fase de desenvolvimento que vise sua maturidade sexual, não se pode generalizar que peixes da mesma idade estejam no mesmo estágio do processo, uma vez que nestes peixes de mesma idade e sob iguais condições, foram encontradas diferenças tanto no diâmetro testicular quanto na quantidade e tipos de células germinativas, assim como testículos em diferentes estágios do ciclo espermatogênico.

Tilápias nilóticas com menos de 2,5g de peso corporal (PC) e em média 3,7cm de comprimento padrão (CP), apresentam o testículo constituído principalmente por tecido conjuntivo, contendo algumas células de Sertoli, células de Leydig, espermatogônias G1, e menor quantidade células G2, podendo estas últimas não estarem ainda presentes. Estes animais encontram-se no estágio de pré-puberdade.

A fase proliferativa da espermatogênese em tilápia nilótica se inicia quando os peixes se encontram na faixa de $3 \pm 0,5$ g de PC e aproximadamente 4cm de CP, enquanto a fase meiótica inicia-se em peixes com $4 \pm 0,5$ g de PC e aproximadamente

5cm de CP.

Referências Bibliográficas

- AIRES, E. D.; STEFANINI, M. A.; ORSI, M. A. Características ultra-estruturais e diferenciativas das espermátides de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante a espermiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 2000. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-959620000003000_02&lng=en&nrm=iso&tlng=pt> Acessado em junho 2008.
- ALEXANDRINO, A. C.; PHAN, M. T.; PINHEIRO, E. F. G. Caracterização macroscópica e microscópica das gônadas do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), durante o ciclo reprodutivo. **Boletim de Zoologia**, 9:159-75, 1985.
- AMER, M. A.; MIURA, T.; MIURA, C.; YAMAUCHIA, K. Involvement of sex steroid hormones in the early stages of spermatogenesis in japanese huchen (*Hucho perryi*). **Biology of Reproduction**, 65:1057-1066, 2001.
- ANDRADE, L. S., **Interação da alcalinidade e densidade de estocagem em juvenis de jundiá (*Rhandia quenel*)**. UFSM. Santa Maria. 2005. 64p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).
- ARANA, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquíicultura: uma revisão para peixes e camarões**. UFSC, Florianópolis, SC. 1997. 166p.
- BARRETO, S. A.; SILVA, A. C.; RIBEIRO M. S.; Reproductive aspects for the pescada-do-piauí, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel, 1840), caught in Pereira de Miranda reservoir (Pentecoste - Ceará State) **Revista Ciência Agronômica**, 34:5-10, 2003.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleosts fish species. **Reproduction Nutrition Development**, 26:877-920, 1986.
- BORG, B. Androgens in teleosts fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 3:219-245, 1994.
- CHAVES-POZO, E.; MULERO, V.; MESEGUER, J.; GARCÍA, A. A. An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the Gilthead Seabream (*Sparus aurata L*). **Biology of Reproduction**, 72:593-601, 2005.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, 52:198-236, 1972.
- CLERMONT, Y. Four decades of research on the biology of the male reproductive system: A few landmarks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 637:17-25, 1991.
- CRUZ-HÖFLING, M. A.; CRUZ-LANDIM, C. Ultrastructural and histological studies on the Leydig and Sertoli cell homologues in the testis of *Triporthus elongatus*

- (Sardinhão) and *Mylossoma aureum* (Pacu). **Cytobios**, 41:161-174, 1984.
- FAO. (2003), Food and Agriculture Organization of the United Nations. Vision general del sector acuicola nacional. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/countrysector/nasobraziles#tcND0064>> Acessado em abril 2008.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed). **Male Reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Communications, p.198-219, 1998.
- GOMEZ-MARQUEZ, J. L., PENA-MENDOZA, B., SALGADO-UGARTE, I. H. Reproductive aspects of *Oreochromis niloticus* (Perciformes: Cichlidae) at Coatetelco lake, Morelos, Mexico. **Revista de Biologia Tropical**, 51:221-228, 2003.
- 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**, 159:331-45, 1980.
- GRIER, H. J.; TAYLOR, R. G. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**, 53:521-542, 1998.
- LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KROBIL, E. NEILL, J. D. (Ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 3:20-30, 1999.
- LOVSHIN, L. L. Tilapia farming: a growing worldwide aquaculture industry. In: **Simpósio Sobre Manejo e Nutrição de Peixes**, 1997, Piracicaba. Anais. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários "Luís de Queiroz". 1:137-164. 1997.
- KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, 203:323-333, 1998.
- KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3. ed. Jundiaí: F. Kubitza. p.97, 1999.
- KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. 1. ed. Jundiaí: F. Kubitza, p.285, 2000.
- MATTA, S. L. **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*)**. UFMG. Belo Horizonte, 2000. 108 p. (Tese, Doutorado em Ciências Biológicas).
- MATTA, S. L. P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L. R. The goitrogen 6-npropyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**; 143:970-978, 2002.
- MENEZES, M. S.; TAKEUTI, D. F.; ARANHA, J. R.; VERANI, J. R.; Males and females gonadal development of *Pseudotothyris obtusa* (Ribeiro, 1911)

- (*Loricariidae*, *Hypoptopomatinae*) **Acta Biológica Paranaense**, Curitiba, 29:89-100, 2000.
- MIURA, T. Spermatogenic cycle in fish. In: KROBIL, E.; NEILL, J. D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 4:571-578, 1999.
- OSTRENSKY, A.; BOEGER, W. **Piscicultura e técnicas de manejo**. Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, 1998. 211p.
- PECIO, A.; BURNS, J. R.; WEITZMAN, S. H.. Comparison of spermiogenesis in the externally fertilizing *Hemigrammus erythrozonus* and the inseminating *Corynopoma riisei* (Teleostei: Characiformes: Characidae). Neotropical Ichthyology. 2007. Version eletrônica disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252007000400005&lng=e&nrm=iso&tlng=e>. Acessado em junho 2008.
- PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, 15:459-97, 1995.
- QUAGIO-GRASSIOTTO, I.; ANTONELI, F. N.; OLIVEIRA, C. Spermiogenesis and sperm ultrastructure in *Cichla intermedia* with some considerations about Labroidei spermatozoa (Teleostei, Perciformes, Cichlidae). **Tissue & Cell**, 35:441-446, 2003.
- ROMAGOSA, E., NARAHARA, M. Y., AIROSA, L. M. S., BORELLA, M. I.; FENERICH-VERANI, N. Reproductive cycle of male matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei: Characidae). **Brazilian Journal of Morphology**, 17:101-105, 2000.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SHINHA HIKIM, A. P; CLEGG, E. D. **Histological and histopatological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press. p.4-20, 1990.
- SAEG. **Sistema para análises estatísticas**. UFV - Central de Processamento de Dados. Viçosa, MG. 1999.
- SALARO, A. L.; YOSHIZO, W.; ZUANON, J. A. S; MOREIRA, D. Qualidade da água na criação de peixes. Belo Horizonte. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, 50:1-8, 2006.
- SCHULZ, W. R.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANÇA, L. R.; VILELA, D. A. R.; GODINHO, H. P. Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology Reproduction**, 73:891-898, 2005.
- SHIMIZU, A. Effect of photoperiod and temperature on gonadal activity and plasma steroid levels in a reared strain of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) during different phases of annual reproductive cycle. **General and Comparative Endocrinology**, 131:310-324, 2003.
- SILVA, M. **Morfologia ultraestrutural do testículo, cinética da espermatogênese e**

- barreira hemo-testicular da Tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (Peixe Ciclídeo).** Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, 1987, 64 p. (Tese, Doutorado em Morfologia).
- SILVA, M.; GODINHO, H. P. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Sarotherodon niloticus*. **Archives of Anatomy and Microscopy**, 72:231-237, 1983.
- SILVA, S.; GODINHO, H. P. Haemato-testicular barrier in *Oreochromis niloticus* Teleost. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, 6:9–13,1989.
- SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MORENO, S. Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva. **Revista UNIMAR**, 16:229-242. 1994.
- SWANN, L. A Fish Farmer's Guide to Understanding Water Quality. Department of Animal Sciences. Illinois-Indiana Sea Grant Program Purdue University. Disponível em: < <http://aquanic.org/publicat/state/il-in/as-503.htm> > Acessado em junho 2008.
- VILELA, D. A. R. **Evolução do processo espermatogênico e investigação da proliferação das células de Sertoli e da duração das fases meiótica e espermiogênica da espermatogênese sob diferentes temperaturas, em tilápias nilóticas (*Oreochromis niloticus*).** Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. Belo Horizonte, 2003. 74p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Biológicas).
- VITULE, J. R. S.; GAZOLA-SILVA, F. F.; ARANHA, J. M. R.; Gonadal development of *Deuterodon langei* Travassos (Teleostei: Characidae). **Acta Biológica Paranaense**. Curitiba, 36:113-119, 2007.
- WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production system in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, 384:465-598. 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10641262>. > Acessado em dezembro 2007.

CAPÍTULO III

Efeitos do Thiodan[®] sobre a morfologia testicular de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sexualmente imatura: análises morfométricas e histopatológicas

Resumo

Foram conduzidas análises morfométricas e histopatológicas em testículos de tilápia nilótica sexualmente imatura ($3,1 \pm 0,7$ g. e $5,5 \pm 0,4$ cm.), após exposição aguda ao endossulfan na sua formulação comercial Thiodan[®], inseticida organoclorado do grupo dos ciclodienos, utilizado nas culturas de cana de açúcar e café para o controle de pragas. A finalidade do presente trabalho foi investigar possíveis alterações morfológicas no parênquima testicular dos peixes expostos a $0,5\mu\text{g/L}$, $1,0\mu\text{g/L}$ e $1,4\mu\text{g/L}$ de Thiodan[®] durante um período de 96 horas, quando comparados com o grupo controle. O experimento foi conduzido em sistema estático, com o objetivo de manter o controle de variáveis, como temperatura da água, fotoperíodo e alimentação, fatores fundamentais no início do ciclo sexual dos teleósteos. No grupo-controle foi observado uma conformação e arranjo celular normais para peixes sexualmente imaturos dessa espécie. Nos peixes expostos a $0,5\mu\text{g/L}$ foi observada alteração estrutural dos espermatozoides. Nos grupos expostos a $1,0\mu\text{g/L}$ e $1,4\mu\text{g/L}$ foram observadas desde leves até severas alterações, tanto na taxa de mitose das células germinativas quanto na estrutura tecidual e no arranjo celular. Observou-se desde dano do tecido conjuntivo, tumefação de células germinativas até necrose severa do testículo. O presente estudo mostrou que o efeito tóxico do Thiodan[®] causa alterações no processo espermatogênico de tilápias nilóticas em fases iniciais de desenvolvimento gonadal, que comprometem de forma direta seu ciclo reprodutivo. Observou-se relação direta da concentração do tóxico com a intensidade das lesões nas gônadas das tilápias expostas, sendo que a temperatura da água tem relação direta com os efeitos tóxicos do Thiodan[®].

Palavras-chave: Tilápia nilótica, análise histopatológica, organoclorados, necrose

testicular.

Effects of Thiodan[®] on the testicular morphology of sexually immature Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): morphometrical and histopathological analysis

Abstract

It was conducted a morphological and histopathological analysis of the testes in sexually immature Nile tilapia ($3,1 \pm 0,7g.$ and $4,4 \pm 0,4cm.$), after an acute exposition to endosulfan in its commercial formulation Thiodan[®]. This is an organochlorine insecticide that belongs to the cyclodiene group and it is used on the coffee and sugar cane cultures for plague control. The purpose of the present study was to observe possible morphological alterations on the testicular parenchyma of the exposed fishes at ($0,5\mu g/L$, $1,0\mu g/L$, $1,4\mu g/L$) of Thiodan[®] during a 96 hour period, and compare them with the control group fishes. The experiment was conducted in controlled conditions on static system, with the objective of maintaining the variables controlled, like water temperature, photoperiod, and feeding, fundamental factors on the beginning of the teleosts sexual cycle. On the control group was observed a normal structural conformation and cellular arrangement for the sexually immature fishes of this species. On the exposed $0,5\mu g/L$ fishes, was observed a structural alteration of the spermatocysts. On the $1,0\mu g/L$ and $1,4\mu g/L$ exposed groups, were observed from slight to severe alterations, as well as on the mitosis rate of the germ cells, the tissue structure and the cellular arrangement. It was observed from damage of the connective tissue, tumefaction of the germ cells to severe necrosis of the testis. The present study showed that the toxic effect of Thiodan[®] causes alterations on the spermatogenesis process in the starting phases of the gonadal development in Nile tilapia, and these alterations comprises in a direct way the reproductive cycle of these species. A direct relation between the toxic concentration and the gonadal damage intensity on the exposed fishes, besides the influence of water temperature on the toxic effects of the Thiodan[®], was observed.

Key-words: Nile tilapia, histopathological analysis, organochlorine, testicular necrosis.

Introdução

Os organoclorados são inseticidas que contêm carbono, hidrogênio e cloro. São classificados em quatro grupos: difenil-alifáticos, hexaclorociclohexanos, ciclodienos e policloroterpenos. O grupo de organoclorados difenil-alifáticos é o mais antigo. Ele inclui o DDT, provavelmente a substância química mais notória do século XX. Em 1948, o entomologista suíço Paul Muller foi recebido o Prêmio Nobel de Medicina pela descoberta da utilidade do DDT no controle dos vetores da malária, febre amarela e muitas outras doenças (WARE, 2004). Os inseticidas ciclodienos, como clordano, aldrin, dieldrin e endosulfan, surgiram após a Segunda Guerra Mundial. A maioria deles é persistente e estável no solo, e relativamente estável, quando exposto à luz solar ou ultravioleta. Por essas características, foram usados principalmente como inseticidas para o controle de cupins e outros insetos cujas fases larvares alimentam-se nas raízes de plantas (WARE, 2004). Atualmente, os fabricantes recomendam seu uso no controle de pragas, principalmente nas culturas de cana de açúcar e café (BAYER 2008).

Não se pode negar o fato desses produtos terem possibilitado o aumento da produtividade agrícola e o auxílio no controle de vetores de diversas doenças. Entretanto, seu uso desordenado e excessivo vem provocando diversos impactos sobre o meio ambiente. Dentre os efeitos nocivos ao ambiente, pode-se citar a presença de resíduos no solo, água, ar, plantas e animais. Além da contaminação do meio ambiente, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar, ocasionando danos à saúde (EDWARDS, 1973).

Em função do modelo de agricultura moderna adotado nos países em desenvolvimento, que se baseia no uso de agrotóxicos (RÜEGG, 1987), estas substâncias passaram a ser amplamente utilizadas nos últimos 50 anos. O aumento do uso de produtos químicos na agricultura tem gerado preocupação crescente quanto aos riscos à saúde humana e ao meio ambiente. Esta preocupação decorre de casos de doenças registradas em seres humanos e das alterações ambientais, perda de ecossistemas e da biodiversidade, e perda da disponibilidade da água como elemento vital de subsistência, fatos que parecem ter como agentes etiológicos os agrotóxicos.

No Brasil, o uso de produtos químicos na agricultura depende do registro concedido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), condicionado à autorização do Ministério da Saúde (MS) e do Instituto Brasileiro do

Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). De acordo com KOTAKA e ZAMBRONE (2001), já foi proibido o uso de uma extensa lista de agrotóxicos entre os quais se encontram os organoclorados, entretanto esses produtos ainda hoje são usados e comercializados em todo o território nacional, sem controle mais rigoroso.

O meio aquático é considerado o mais relevante compartimento receptor de tóxicos. Substâncias químicas lançadas no ar ou no solo irão atingi-lo através das chuvas, lavagem do solo e infiltrações, gerando perturbações além de graves conseqüências para a saúde humana (ROSA 1998). Estes motivos tornam pertinente a realização de estudos de toxicidade aquática que permitam quantificar os danos causados pelo uso inadequado de agrotóxicos sobre os ecossistemas em geral e, a partir de então, tentar modificar a legislação sobre a produção, comercialização e uso dos agrotóxicos na agricultura moderna.

Tendo em vista o anteriormente mencionado, o presente estudo visa avaliar o efeito do organoclorado endosulfan sobre a reprodução de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), avaliando-se a morfologia e o desenvolvimento gonadal de indivíduos jovens expostos ao agrotóxico.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária (DVT) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no período de 03 de outubro a 28 de novembro de 2007, totalizando 56 dias. O processamento das amostras foi conduzido no Setor de Morfologia do DVT/UFV. A microtomia, coloração e montagem das lâminas foram realizadas no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral (DBG)/UFV. As análises histológicas e morfométricas foram realizadas nos Laboratórios de Histopatologia do DVT e de Biologia Estrutural do DBG/UFV. As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Histopatologia do DVT. As imagens digitais foram obtidas no Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia Vegetal (UFV).

Animais

Foram utilizados 40 tilápias nilóticas (*O. niloticus*), var. tailandesa, machos, sexualmente imaturos obtidos na Piscicultura da Prata, na cidade de Eugenópolis

(Minas Gerais, Brasil). Os animais tinham 30 dias de vida, peso corporal de $3,1 \pm 0,7$ g e comprimento padrão de $4,4 \pm 0,4$ cm. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do DVT/UFV. Os grupos experimentais foram previamente selecionados com base na homogeneidade de peso e tamanho corporal, com objetivo de se comparar o efeito do tóxico sobre animais com características semelhantes. Todos os procedimentos que envolveram uso de animais na pesquisa seguiram as “Normas de conduta para o uso de animais no ensino, pesquisa e extensão do DVT/UFV” (Protocolo n. 74/2007).

Condições laboratoriais

Os peixes foram aclimatados durante 10 dias em aquários de vidro com capacidade para 50 litros numa densidade de 1g de peixe por litro de água livre de cloro, em temperatura média de $26 \pm 1^\circ\text{C}$, monitorada duas vezes por dia. Todos os aquários contaram com sistema de filtração (250L/h.) e aeração contínua de água para garantir o bem-estar dos animais. O fotoperíodo, monitorado por “*timer*”, foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro. Os peixes foram alimentados com ração comercial (32% PB), na razão de 8-10% da biomassa/dia, fornecida quatro vezes ao dia (às 8, 11, 14, 17 h). Os aquários foram sifonados uma vez por dia para eliminar restos de matéria orgânica e, no mesmo momento, era feita a substituição de 25% da água de cada aquário por água limpa e livre de cloro, para garantir a boa qualidade da água. Após esse procedimento, os peixes foram distribuídos nos aquários experimentais em iguais condições. Foram determinados parâmetros de qualidade da água ao longo do período experimental como, pH, temperatura, oxigênio dissolvido, amônia total e amônia tóxica, condutividade elétrica, e dureza total, para constatar que alterações desses parâmetros não interferissem nos resultados do presente estudo .

Tratamentos do teste de toxicidade aguda em sistema estático

Os peixes foram divididos em quatro aquários de vidro com capacidade de 50 litros de água, em grupos de 10 peixes, um grupo-controle e três expostos a concentrações crescentes 0,5-1,0-1,4 $\mu\text{g/L}$ do inseticida organoclorado endosulfan na sua apresentação comercial Thiodan[®] CE (Bayer) formulação do tipo concentrado emulsionável. As concentrações utilizadas foram estabelecidas a partir de dados da

literatura que reportam CL₅₀ 96-hr para peixes de água doce entre 1.4 e 1.5µg/L (JOHNSON e FINLEY, 1980), e CL₅₀ 96-hr para tilápia nilótica como sendo de 1,42µg/L (MUSANHI, 1987).

O teste de toxicidade aguda (96hs) com o Thiodan[®] (endosulfan) foi realizado baseando-se nas normas técnicas para teste em sistema estático da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2006). Em cada aquário experimental os peixes que foram alimentados normalmente, e diariamente observados, o comportamento e a sobrevivência.

Obtenção dos dados biométricos

Uma vez terminado o período de 96 horas, os peixes do grupo-controle e dos grupos tratados foram coletados e transferidos para solução aquosa de benzocaína 1:10.000, seguida de aprofundamento de anestesia até eutanásia. Foram obtidos os dados biométricos como peso corporal (PC), e comprimento-padrão do focinho até o pedúnculo caudal (CP). Os comprimentos, em centímetros, foram obtidos com auxílio de paquímetro, e o peso corporal, em gramas, determinado em balança de precisão com sensibilidade de 0,01g.

Coleta de gônadas e microscopia de luz

Após incisão longitudinal ventral da parede celomática, os testículos foram removidos, seccionados transversalmente na porção média e imediatamente fixados em líquido de Bouin por um período de 24 horas e depois preservado em etanol 70%. Os fragmentos de testículo foram transferidos para etanol 90% por 4 horas e, logo após, mantidos numa solução álcool:resina 1:1 por 12 horas, sendo transferidos posteriormente para resina pura por 24 horas, e finalmente incluídos em glicol-metacrilato (Historesin[®], Leica).

A microtomia dos fragmentos foi feita em cortes seriados com 3 µm de espessura em micrótomo automático (Reichert-Jung) utilizando navalha de vidro, e submetidos à coloração com hematoxilina-eosina de Harris, azul de toluidina em borato de sódio (1%) e tricrômico de Gomori. As lâminas histológicas foram analisadas em microscópio de luz Olympus CX40. As imagens digitais foram capturadas por meio de

fotomicroscópio Olympus AX70 TRF.

Análises morfométricas

Os efeitos do endosulfan na morfologia dos testículos dos animais expostos foram avaliados, quantificados, e comparados com o grupo-controle. Visando isso, foram conduzidas contagens de espermatogônias primárias e secundárias seguindo metodologia adotada por MATTA (2000). O número médio de espermatogônias primárias (G1) e secundárias (G2) foi obtido por meio de contagens de células nos cortes seriados, realizada em 10 cortes para cada peixe, atentando-se para não contar a mesma célula duas vezes. Para isso, foram obtidas quatro preparações histológicas para cada animal. Em cada uma delas, foram colocados doze cortes. Em função de valores já pré-determinados para o tamanho dessas células, a contagem foi conduzida em um a cada cinco cortes. As proporções volumétricas foram feitas segundo as seguintes formulas:

Volume testicular analisado, em mm^3 = Volume de contagem celular

$$\text{Volume, em } \text{mm}^3 = (\text{Área testicular, em } \text{mm}^2) * (\text{Comprimento, em } \text{mm})$$

Onde a área testicular pertence à área do terço médio do testículo em corte transversal, e o comprimento se refere ao comprimento do testículo que foi analisado nas contagens.

Número de células germinativa/ mm^3 = Quantidade espermatogônias G1 em mm^3

$$G_1 \text{ por } \text{mm}^3 = \frac{\text{Células G1}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{n. de Células G1}}{\text{Volume}}$$

Número de células germinativas/ mm^3 = Quantidade espermatogônias G2 em mm^3

$$G_2 \text{ por } \text{mm}^3 = \frac{\text{Células G2}}{\text{mm}^3} = \frac{\text{n. de Células G2}}{\text{Volume}}$$

Realizou-se, também, a medição do diâmetro de 10 núcleos de G1 e 10 núcleos de G2, escolhidos ao acaso em cada peixe, utilizando régua micrométrica e aumento de

1000X. A partir desses valores, foi conduzida análise estatística dos dados para determinar se existe diferença significativa no diâmetro nuclear dessas células entre os três grupos estudados. A área testicular, em mm^2 , foi calculada por meio do software Image-Pro Plus especializado para esse fim, a partir de imagens digitais obtidas de cortes transversais do terço médio dos testículos em fotomicroscópio Olympus AX70 TRF.

Análises histopatológicas

Foi realizada análise histopatológica dos preparados histológicos nos diferentes grupos tratados e comparados com no grupo-controle, com o fim de se descrever as lesões causadas pelo endossulfan como: diminuição no componente celular, dano do tecido conjuntivo, degeneração e/ou tumefação celular, necrose total ou parcial do parênquima testicular.

A porcentagem da área de tecido necrosado foi quantificada por meio de contagens de pontos (tecido sadio e tecido necrosado) em gradícula milimétrica sobre micrografias dos cortes transversais de testículos dos grupos tratados e os dados obtidos foram comparados com aqueles do grupo-controle com a finalidade de se estabelecer a possível tendência do comportamento tóxico do thiodan nas diferentes concentrações sobre os testículos de tilápia nilótica jovem.

Análises estatísticas

Para efeitos estatísticos, cada peixe foi tomado como uma repetição dentro do seu grupo. Todos os valores obtidos para os diferentes parâmetros investigados nos diferentes grupos foram expressos como média \pm desvio-padrão ($M \pm DP$). As variáveis quantitativas obtidas nos estudos dos diferentes grupos foram submetidas aos testes de normalidade (Lilliefors) e homogeneidade (Cochran & Bartlett). Quando apresentaram significância após análise de variância (ANOVA), realizou-se o teste de Duncan ($p < 0,05$) para comparar os valores médios entre os grupos experimentais (SAEG, 1999).

Resultados e discussão

Qualidade da água

A Tabela 1 apresenta as variáveis físico-químicas da água consideradas durante o período experimental.

Tabela 1. Parâmetros de qualidade físico-química da água.

<i>Variável</i>	<i>Controle</i>	<i>Tratamento I</i> <i>0,5µg/L</i>	<i>Tratamento II</i> <i>1,0µg/L</i>	<i>Tratamento III</i> <i>1,4µg/L</i>
pH	6,97 ± 0,08 a	7,0 ± 0,0 a	6,97 ± 0,08 a	7,0 ± 0,13 a
Temperatura. °C	25,8 ± 0,6 a	25,7 ± 0,9 a	26,7 ± 0,6 b	26,2 ± 0,8 ab
Amônia total mg/L	2,1 ± 1,03 a	1,9 ± 0,7 ab	1,7 ± 0,5 bc	1,5 ± 0,58 c
Amônia tóxica mg/L	0,015 ± 0,010 a	0,016 ± 0,009 a	0,013 ± 0,005 a	0,009 ± 0,003 a
Dureza mg CaCO ₃ /L	72,5 ± 2,15 a	71,5 ± 1,10 a	75,0 ± 7,8 a	74,3 ± 5,7 a
Oxigênio mg/L	6,6 ± 0,5 a	6,4 ± 0,8 a	6,7 ± 0,5 a	6,7 ± 0,5 a
Condutividade µ.S/cm	92,5 ± 13,6 a	91,5 ± 12,1 a	93,2 ± 14,3 a	94,9 ± 14,4 a

Média ± Desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Estas variáveis foram consideradas nas faixas ideais para o desenvolvimento adequado de peixes tropicais, assim como para os indivíduos jovens de tilápia nilótica. A respeito dessas variáveis, no que tange ao pH, os valores encontrados nos diferentes grupos não apresentaram diferença nem no tempo ao longo do experimento, nem entre os diferentes grupos, mantendo-se entre (7,0 ± 0,1). Embora a tilápia consiga sobreviver em pH entre 5 e 11 (WATANABE et al., 2002), o recomendado para peixes tropicais encontra-se entre 7 e 8, uma vez que valores inadequados podem prejudicar o desempenho dos peixes (SALARO et al., 2006).

A faixa térmica ideal para as espécies de peixes tropicais varia entre 24 a 32°C. A temperatura ideal para o desenvolvimento da tilápia nilótica situa-se entre 26 e 32°C (KUBITZA, 2000). O grupo exposto a 1,0µg/L registrou a temperatura mais alta. Porém, mesmo sendo variações reduzidas, a temperatura desse grupo foi significativamente diferente, atingindo 27,3 °C. Esse fato pode ter contribuído para a observação de efeitos mais graves do endossulfan dentro desse grupo, uma vez que a toxicidade dos organoclorados do grupo dos ciclodienos tem relação direta com a

temperatura (WARE, 2004).

Pode-se observar uma relação inversamente proporcional na concentração de amônia total dos diferentes grupos em função da dose do tóxico que foi utilizada, o que pode ser devido à diminuição de consumo de alimento dos peixes expostos a maiores concentrações. Isso leva à diminuição do conteúdo de matéria orgânica presente nos aquários dos peixes tratados em relação ao aquário do grupo-controle, aspectos comportamentais que serão discutidos mais adiante.

Foi verificada relação direta dos níveis de amônia em função do tempo, visto que os aquários não foram limpos durante todo o período experimental. Entretanto, amônia total e amônia tóxica não atingiram níveis que oferecessem risco para a saúde dos peixes. A Figura 1 mostra, os valores médios da concentração de amônia total em todos os aquários ao longo do período experimental, apresentando um aumento diário aproximado de 0,5mg/L com um valor máximo de 2,6mg/L após as 96 horas do experimento.

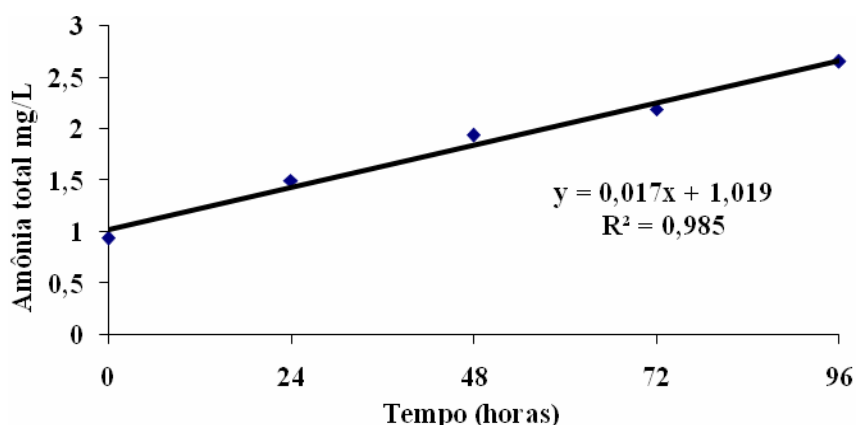


Figura 1. Níveis de amônia total (mg/L) em função do tempo (horas).

A variação da quantidade de amônia tóxica dentro dos aquários ao longo do experimento não mostrou diferença relacionada à concentração do tóxico nos diferentes grupos. Ao longo do tempo, apresentou diferença altamente significativa nas diferentes mensurações realizadas, registrando um aumento diário aproximado de 0,005mg/L, atingindo em 96 horas seu valor máximo (0,02mg/L). A Figura 2 apresenta, os valores médios da concentração de amônia tóxica em todos os aquários ao longo do período experimental.

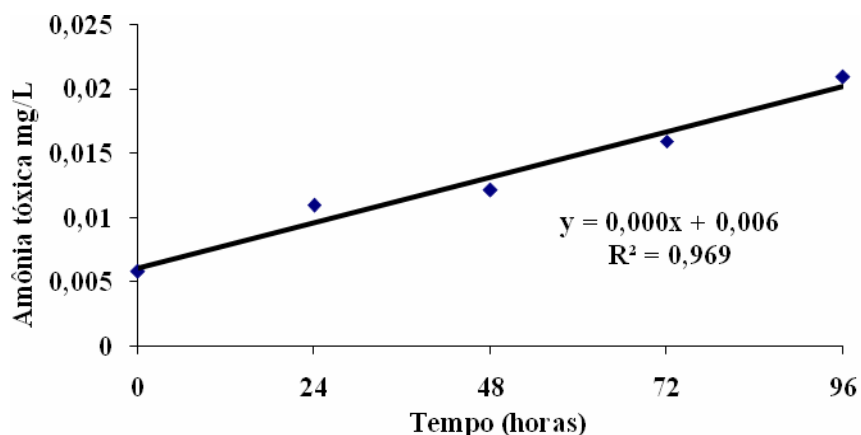


Figura 2. Níveis de amônia tóxica (mg/L) em função do tempo (horas).

Apesar de a tilápia tolerar altos níveis de amônia tóxica ou não-ionizada (2,4 a 3,4 mg/L), para ARANA (1997) e KUBITZA (1999), níveis de amônia não-ionizada entre 0,15 e 1,0 mg/L podem levar à diminuição do crescimento dos peixes, enquanto exposições contínuas ou freqüentes a 0,2mg/L podem ser prejudiciais para os peixes. Segundo ABDALLA (2003), em exposição aguda de 96 horas a concentração letal de amônia não-ionizada para peixes varia de 0,32 a 3,1 mg/L. O tamanho dos animais tem grande influência no nível de toxicidade, pois peixes menores recebem maior dosagem por unidade de peso que peixes maiores, sendo mais susceptíveis à toxicidade da amônia não-ionizada. Assim, os resultados encontrados no presente experimento não chegam a representar ameaça tóxica para os peixes por encontrarem-se dentro dos níveis de tolerância estabelecidos para a espécie.

O bom crescimento dos peixes ocorre quando os níveis de oxigênio situam-se entre 5 e 6 mg/L (SALARO et al., 2006). Segundo WATANABE et al. (2002), a tilápia nilótica tolera baixos níveis de oxigênio dissolvido na água (1,0 ppm ou mg/L). De um modo geral, tem sido demonstrado que valores menores que 5 mg/L podem causar diminuição no ganho de peso, e valores menores que 1mg/L durante períodos prolongados podem ser letais para algumas espécies de peixes (OSTRENSKY e BOEGER, 1998; KUBITZA, 1999). No presente estudo, os níveis de oxigênio dissolvido se mantiveram em faixas próximas, sem apresentar diferença significativa. O mesmo ocorreu com valores encontrados para dureza total, que não mostraram diferença

nem entre os grupos experimentais nem ao longo do tempo, mantendo-se dentro dos limites estabelecidos para o cultivo de peixes de água doce. Segundo OSTRENNISKY & BOEGER (1998) e KUBITZA (1999), esta variável não deve estar abaixo de 20mg/L. Para SWANN (2008), valores de dureza total mínimos de 20mg/L devem ser mantidos para um ótimo crescimento de organismos aquáticos e relata valores de dureza total aceitáveis entre 20-400mg/L.

Os valores médios de condutividade elétrica do presente trabalho não apresentaram diferença entre os grupos, nem no tempo nem entre os tratamentos, e se mantiveram uniformes na faixa de $93 \pm 13,6 \mu\text{S}/\text{cm}$, valores estes encontrados dentro dos parâmetros registrados geralmente nas pisciculturas. SIPAÚBA-TAVARES e MORENO (1994) verificaram um padrão similar de flutuação da condutividade em viveiros de piscicultura, em período de seca e período de chuva, variando de $40 \mu\text{S}/\text{cm}$ a $120 \mu\text{S}/\text{cm}$, com os maiores valores obtidos no período de seca.

Toxicidade do endosulfan e seu efeito no comportamento dos peixes expostos

Observações realizadas ao longo do período experimental, tanto no grupo-controle quanto nos grupos tratados, revelaram mudanças no comportamento dos grupos expostos ao tóxico, percebidas logo no início do teste de toxicidade.

Uma hora após a diluição do tóxico na água, os animais começaram a apresentar sintomas nervosos de intoxicação, principalmente nos aquários com concentrações de endosulfan de 1,0 e 1,4 $\mu\text{g}/\text{L}$. Foram observadas alterações como nado errático, aumento do movimento opercular, perda da coordenação motora, corpo em posição lateral e aumento na excitabilidade, além de fortes contrações. Alterações similares foram observadas por CAPKIN et al. (2006), quando pesquisaram o efeito do endosulfan em truta arco-íris exposta a 1,3 $\mu\text{g}/\text{L}$ do tóxico. GIUSI et al. (2005) constataram alterações similares em *Thalassoma pavo* quando exposto durante uma semana a 1,3 $\mu\text{g}/\text{L}$, sendo que alterações como hiperventilação, diminuição do consumo de alimento, frequência de alimentação e hiperexcitabilidade foram observadas inclusive com exposição a 0,2 $\mu\text{g}/\text{L}$, embora em menor intensidade. Esses dados mostram mais uma vez o efeito dose-dependente do endosulfan. Estes autores reportam também a possível relação desses efeitos tóxicos com danos cerebrais induzidos pelo endosulfan. Estes dados mostram como o *Thalassoma pavo* apresenta maior sensibilidade ao endosulfan do que a tilápia

nilótica, já que esta última apresentou sintomas nervosos de intoxicação nas concentrações de 1,0 e 1,4µg/L no presente estudo.

Após 12 horas da diluição do tóxico nos aquários, os peixes foram novamente alimentados, o que correspondeu a 24 horas de jejum. Nestes mesmos aquários (com 1,0 e 1,4µg/L), observou-se diminuição no consumo de alimento, que se manteve normal nos aquários do grupo-controle e do grupo exposto a 0,5µg/L. Além de intoxicação dos peixes por contato e ingestão da solução (endosulfan/água), a ingestão de tóxico se faz também pelo alimento visto que a molécula do endosulfan tem afinidade pela matéria orgânica em suspensão (TOMITA et al., 2002, SOARES et al., 2003).

Os sintomas descritos anteriormente tornaram-se menos evidentes à medida que o tempo de experimento transcorreu. Alguns peixes mostraram total recuperação, outros não conseguiam se recuperar totalmente. Entretanto, não ocorreu, mortalidade durante o período experimental. Um aumento na camada de muco na pele e nas brânquias dos peixes expostos ao tóxico foi observado no momento da coleta, situação também observada por DUTTA et al. (2006) ao estudar *Lepomis macrochirus* expostos a 15µg/L endosulfan. NOWAK (1992) estudando peixes-gato (*Tandanus tandanus*) expostos a 1,0µg/L de endosulfan, observou sintomas que sugerem irritação das brânquias (edema, esfacelamento e hiperplasia do epitélio laminar) desde 24 horas até 28 dias após a exposição, sugerindo que o endosulfan é irritante para as brânquias e aumenta a distância de difusão respiratória. Essas lesões concordam com o achado por CAPKIN et al. (2006) em truta arco-íris após exposição aguda a concentrações crescentes de endosulfan a partir de 1,3µg/L, durante 24 a 96 horas. Para esses autores, as lesões branquiais causadas pelo endosulfan resultam em uma diminuição da eficiência respiratória por redução do fluxo de água através das brânquias, podendo ser uma das causas dos efeitos neuronais do endosulfan.

Dados biométricos e análises morfométricas dos testículos

A Tabela 2 apresenta os dados biométricos dos peixes do grupo-controle e dos peixes expostos às diferentes concentrações de endosulfan, após o teste de toxicidade aguda. Diferenças estatísticas não foram encontradas nos diferentes grupos.

Tabela 2. Peso corporal (PC) em g, e comprimento-padrão (CP) em cm, de tilápias nilóticas sexualmente imaturas.

<i>Variável</i>	<i>Controle</i>	<i>Tratamento I</i> <i>0,5µg/L</i>	<i>Tratamento II</i> <i>1,0µg/L</i>	<i>Tratamento III</i> <i>1,4µg/L</i>
PC	3,2 ± 0,8 a	3,1 ± 0,6 a	2,9 ± 0,8 a	3,1 ± 0,5 a
CP	4,4 ± 0,4 a	4,3 ± 0,3 a	4,3 ± 0,4 a	4,4 ± 0,3 a

Média ± Desvio-padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Todos estes animais apresentavam a fase proliferativa da espermatogênese, com testículos apresentando espermatocistos, contendo espermatogônias primárias (G1) até espermatogônias secundárias (G2), condição de homogeneidade que facilitou a comparação entre os grupos estudados.

A Tabela 3 mostra os dados obtidos das medidas da área testicular realizadas em cortes transversais do terço médio da gônada, e o diâmetro médio dos núcleos das espermatogônias G1 e G2, nos diferentes grupos experimentais.

Tabela 3. Área testicular (AT) em μm^2 , diâmetro nuclear (DN) médio das espermatogônias G1 e G2, em μm .

<i>Tratamento</i>	<i>n.</i>	<i>AT</i> <i>M ± DP</i>	<i>DN G1</i> <i>M ± DP</i>	<i>DN G2</i> <i>M ± DP</i>
<i>Controle</i>	10	26624,5 ± 9005,8 a	10,65 ± 1,36 a	7,17 ± 0,86 a
<i>0,5µg/L</i>	10	25714,35 ± 8399,3 ab	10,56 ± 0,97 a	7,03 ± 0,88 a
<i>1,0µg/L</i>	10	16893,3 ± 8844,5 b	10,23 ± 0,97 a	6,48 ± 0,93 a
<i>1,4µg/L</i>	10	20656,79 ± 8907,4 ab	10,17 ± 0,95 a	6,25 ± 0,75 a

n: número de peixes; Média ± Desvio-padrão. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os valores obtidos para área testicular mostraram diferença significativa ($p < 0,05$) no tratamento 1,0µg/L quando comparado com o grupo-controle. Observações similares também são descritas por DUTTA et al., (2006) testando os efeitos do endossulfan em peixes, e por JAISWAL et al. (2005) quando estudando testículo de rato exposto ao endossulfan. As médias obtidas para variáveis como diâmetro nuclear de células G1 e G2, não mostraram diferença significativa entre os grupos.

Quantificação de células germinativas

O estudo quantitativo mostra valores médios para a população de células germinativas dos tipos G1 e G2 por mm^3 nos grupos experimentais (Figura 3). O grupo-controle e o grupo exposto a $0,5\mu\text{g/L}$ mostraram a maior população de G1, diferindo significativamente do grupo exposto a $1,4\mu\text{g/L}$.

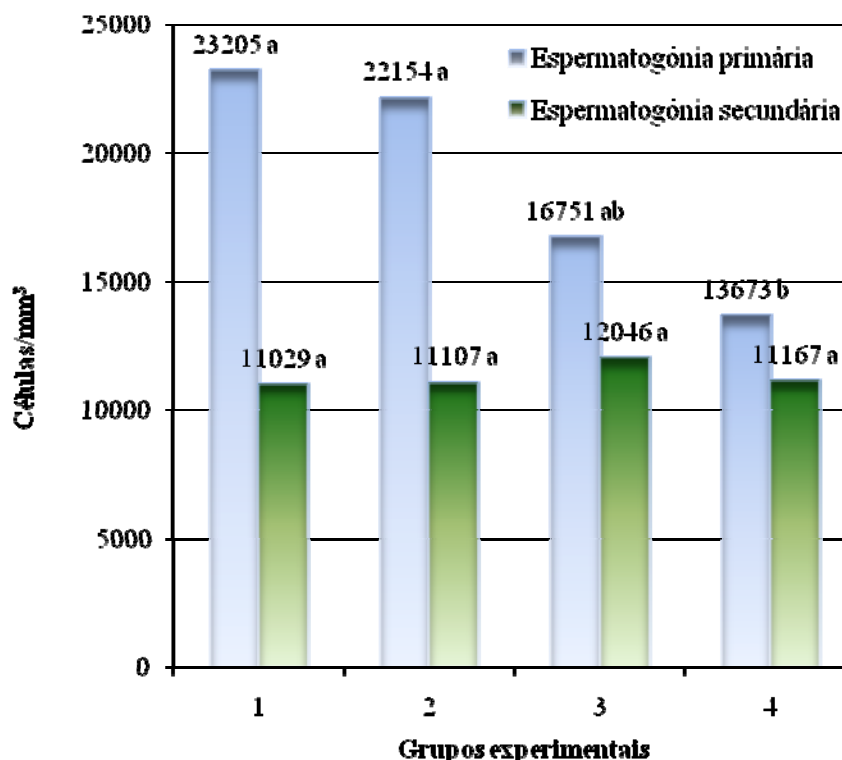


Figura 3. Quantidade de células G1 e G2/ mm^3 no grupo-controle (1) e nos diferentes tratamentos (2= $0,5\mu\text{g/L}$; 3= $1,0\mu\text{g/L}$; 4= $1,4\mu\text{g/L}$). Letras diferentes na mesma série indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Nos peixes do presente estudo, tanto as espermatogônias primárias quanto as espermatogônias secundárias, encontram-se em plena atividade mitótica, e o testículo está começando a ser povoado por essas células germinativas, o que leva a uma alta taxa de mitose e, conseqüentemente, a uma maior susceptibilidade dessas células a agentes que possam afetar a espermatogênese. De fato, o processo de mitose das células germinativas do tipo G1 nos peixes expostos às maiores concentrações do tóxico foi notadamente menor quando comparado com o grupo-controle e com o grupo exposto a $0,5\mu\text{g/L}$.

Segundo RUSSELL et al, (1990), a destruição completa das células-tronco leva

à perda irreversível da capacidade espermatogênica do testículo, uma vez que estas células são fonte potencial de células germinativas que irão repovoar o túbulo seminífero após o esgotamento do órgão. Para esses autores a fase de proliferação celular é, sem dúvida, uma das fases mais vulneráveis do ciclo celular (RUSSELL et al., 1990), podendo ser facilmente afetada por agentes poluentes.

Os agrotóxicos, além de outros poluentes ambientais (metais pesados, derivados do petróleo e esgotos domésticos ou industriais), penetram no meio ambiente alterando não só o ecossistema, mas também organismos vivos, onde as moléculas dos tóxicos geram distúrbios a nível celular, promovendo alterações de membrana que refletem no ciclo celular nas suas diferentes etapas (NAZ, 1999).

O presente estudo mostra que o endossulfan tem um efeito negativo sobre a fase de mitose das células germinativas, fato também relatado por DUTTA et al. (2006) quando estudaram o peixe “bluegill” (*Lepomis macrochirus*). Estes autores observaram diminuição no número das espermatogônias, assim como, observado no presente estudo, além de diminuição no tamanho das células germinativas e no diâmetro dos túbulos seminíferos, e após exposição aguda ao endossulfan (1,0µg/L). Efeitos similares têm sido evidenciados por outros autores. YAMAGUCHI (2007) estudando o efeito de metais pesados na espermatogênese de diversas espécies, observou que o processo de espermatogênese não prosseguiu além das espermatogônias, pois o mesmo foi interrompido por morte celular. Pesquisando o efeito dos poluentes na reprodução dos peixes, DUTTA et al. (2003) relataram a interrupção da fase de proliferação na espermatogênese do “bluegill” *Lepomis macrochirus* após uma exposição aguda ao diazinon (60 mg/L), inseticida organofosforado utilizado no controle de insetos no solo e nas plantas.

Segundo pesquisa realizada por JAISWAL et al. (2005), nos mamíferos o endossulfan também provoca depleção na espermatogênese devido à citotoxicidade, o que resulta na morte por necrose de células germinativas imaturas no epitélio seminífero. Como resultado, se reduz o número total de células disponíveis para a espermatogênese, o que também conduz a uma diminuição do peso e do tamanho do testículo. Segundo estes autores, o tratamento com ácido 5-aminosalicílico (5-ASA), um potente anti-oxidante, na dose de 25mg/kg de PC por via intraperitoneal, reduz significativamente os efeitos do endossulfan em ratos expostos, induzindo aumento do peso e tamanho do testículo, mostrando a recuperação da espermatogênese nos túbulos.

Análises histopatológicas

No grupo-controle, os testículos mantiveram sua histologia normal, com tecido conjuntivo e estruturas intersticiais íntegras, cistos germinativos bem definidos, a morfologia das células germinativas, assim como a morfologia e a proliferação das células de Sertoli mantiveram seu padrão, e a cápsula de tecido conjuntivo que reveste o órgão apresentou-se normal. No grupo exposto a 0,5µg/L, foi observado processo degenerativo das células germinativas, assim como processos de necrose em cistos germinativos de alguns peixes, no entanto, com as populações de células G1 e G2 se mantendo similares ao encontrado para o grupo-controle (Figura 3).

Por outro lado, nos grupos tratados com 1,0 e 1,4µg/L foi observada diminuição severa na população de espermatogônias G1, com algumas delas apresentando núcleos ainda visíveis e outras não. Tumefação das espermatogônias com aspecto granuloso e aumento da acidofilia no citoplasma, alteração esta compatível com o proposto por PEREIRA (2004a) como degeneração hidrópica. Segundo estes autores, a degeneração hidrópica pode ser causada por alterações das bombas eletrolíticas das membranas (citoplasmáticas e das organelas), devido a um déficit na produção ou consumo de ATP como ocorre na hipóxia. Entre outras causas, esse tipo de degeneração pode ser devido a agressões que geram radicais livres, os quais lesam diretamente a membrana celular (metabólitos do endosulfan). Lesões similares foram descritas por JAISWAL et al. (2005) quando estudando testículo de rato exposto a 7,5-10 mg/kg PC endosulfan por via oral durante 10 dias. Estes autores atribuem a necrose testicular ao efeito oxidante dos metabólitos do endosulfan e recomendam o tratamento com antioxidantes tanto na prevenção quanto na recuperação dos danos.

No presente estudo, os testículos mais afetados apresentaram processos de necrose semelhantes à necrose do tipo coagulativa. Nesses órgãos foi observada, além da necrose grave do parênquima testicular, perda parcial ou total do peritônio visceral que reveste externamente o órgão. A Figura 4 mostra cortes transversais dos testículos do grupo-controle e daqueles submetidos às diferentes concentrações do endosulfan, apresentando nos primeiros a conformação normal do órgão, contendo diferentes cistos de células germinativas, e nos grupos tratados, diferentes alterações causadas pelo tóxico na estrutura tecidual do parênquima. As principais alterações do parênquima testicular foram diminuição na quantidade de células germinativas, tumefação das mesmas, compatível com degeneração hidrópica, e necrose parcial ou total do órgão.

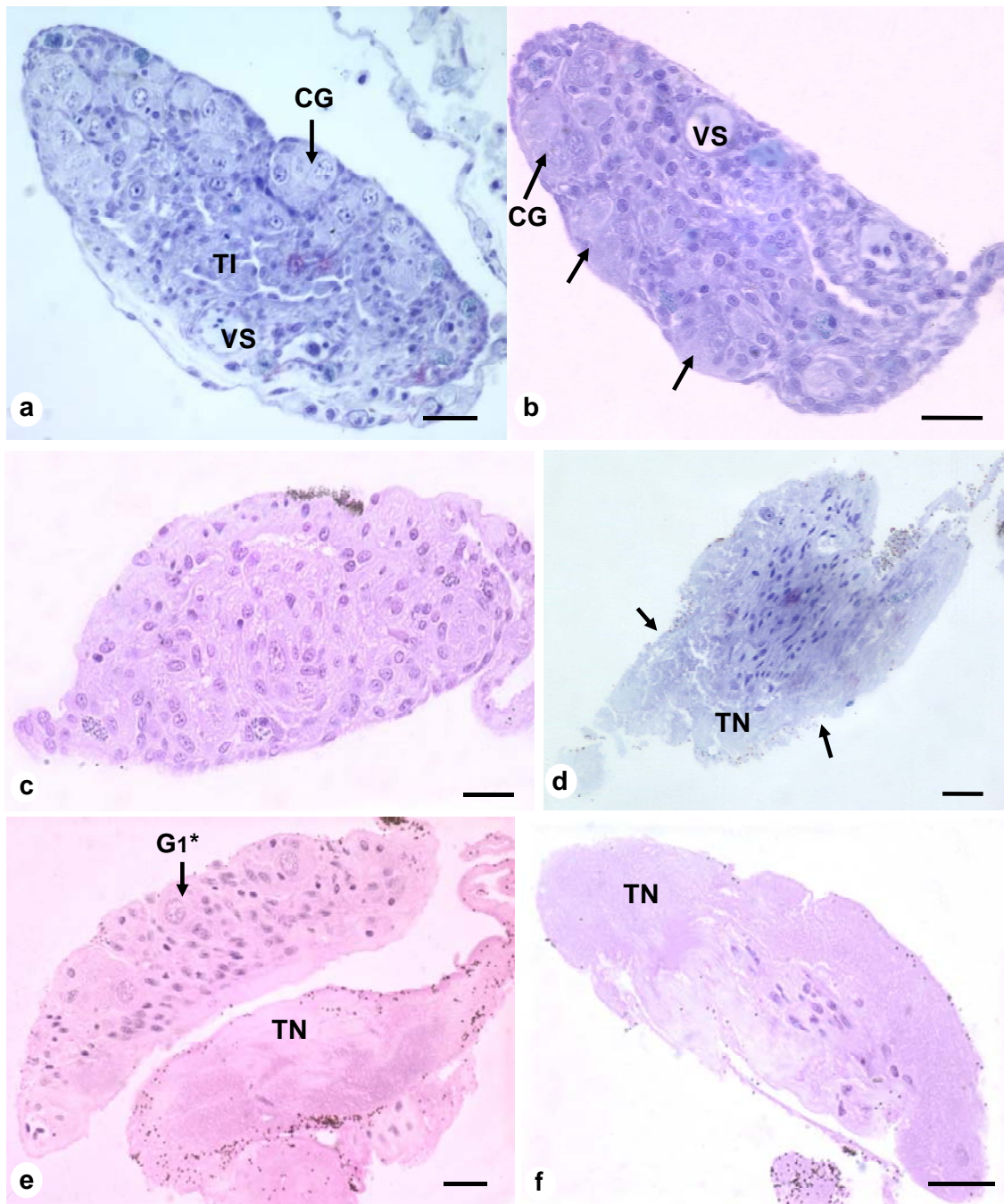


Figura 4. Cortes transversais do terço médio de testículos de tilápias nilóticas jovens. Em (a) grupo controle apresentando espermatocistos ou cistos germinativos (CG), tecido intersticial (TI), e vasos sanguíneos (VS). A estrutura geral do órgão se manteve normal. Em (b), grupo exposto a 0,5µg/L observam-se cistos germinativos (CG, setas) contendo células germinativas em processo degenerativo (aumento da acidófila do citoplasma e perda do núcleo). Em (c-d-e) grupo exposto a 1,0µg/L, observa-se desde perda da estrutura dos cistos germinativos (c) até processos degenerativos com grandes áreas de tecido necrosado (TN), com ou sem perda da cápsula de revestimento externo do órgão, mesotélio (d, setas). Pode-se observar, também, em (e), células germinativas sofrendo processo degenerativo com tumefação e aumento de tamanho (G1*) e perda da conformação normal dos cistos. No grupo exposto a 1,40µg/L (f), observa-se processo de necrose coagulativa ou isquêmica, presente em grande parte do parênquima testicular. Coloração: a-b-d, azul de toluidina; c-e-f, hematoxilina-eosina. Barra: 20µm.

A porcentagem de necrose nos testículos foi quantificada a partir de análises histológicas de secções do terço médio do órgão e comparada com o grupo-controle. Nesse grupo, nenhum peixe (0/10) apresentou necrose do parênquima testicular nem de qualquer componente do órgão. No grupo exposto a 0,5µg/L, em alguns peixes (2/10) foram encontradas áreas de necrose circunscritas aos cistos de células germinativas, quantificadas em até 30% da área dos cortes histológicos estudados. Nos grupos 1,0µg/L (4/10) e 1,4µg/L, (4/10) foram observados processos de necrose que atingiram 100% e 89% dos cortes histológicos estudados, respectivamente, e que podem ser uni ou bilaterais, levando com isso à perda significativa ou absoluta da capacidade reprodutiva dos peixes. Ao que parece, a diferença de temperatura na água dos aquários expostos a 1,0µg/L influenciou o grau de toxicidade atingido pelo endossulfan nesses peixes, causando em alguns desses animais lesões mais graves que aquelas encontradas no grupo exposto à maior concentração do tóxico.

Na análise quantitativa do dano tecidual (tecido sadio *versus* tecido necrosado), as porcentagens médias para cada grupo (n=4) foram ajustadas a um modelo de regressão linear com o objetivo de se calcular o efeito do tóxico no testículo das tilápias nilóticas expostas a uma temperatura aproximada de $26 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$, assumindo que o observado no terço médio do testículo foi comum para outras regiões do órgão. A Figura 5 mostra os valores médios de parênquima testicular necrosado quantificado nos peixes que apresentaram a lesão, comparados com igual numero de peixes do grupo-controle.

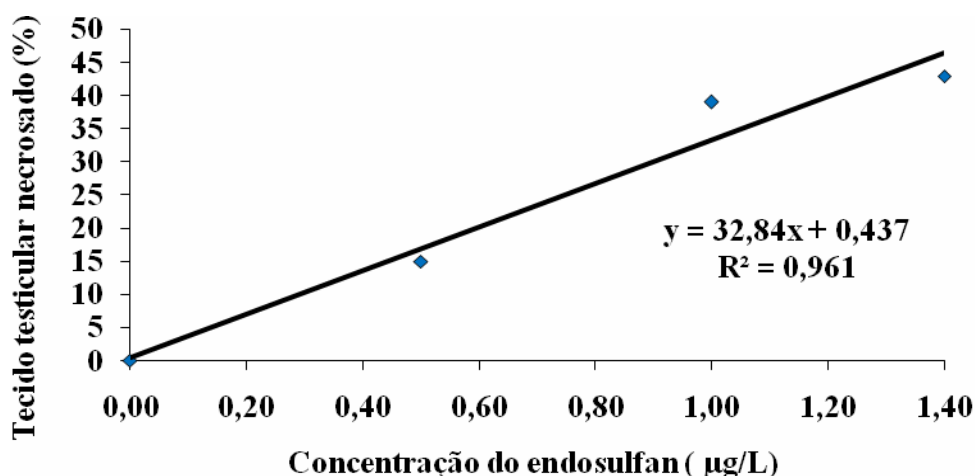


Figura 5. Porcentagem de área do parênquima testicular necrosado em função da concentração de endossulfan na água.

A linha de tendência mostra o comportamento desta lesão em função da concentração do endosulfan na água, indicando que a maior percentagem de tecido necrosado (46.42%) apresenta-se na concentração de 1,4µg/L, o que demonstra quanto maior concentração do produto na água, maior dano tecidual no testículo. Estes dados concordam com achados de outros pesquisadores quando relataram o efeito do endosulfan como dose-dependente. Para CENGIZ et al. (2001), os efeitos do endosulfan são tempo- e dose-dependentes, agindo tanto no sistema reprodutivo dos animais quanto em outros sistemas e aparelhos. De modo similar, foi observado processo de necrose em outros peixes expostos ao endosulfan. DUTTA et al. (2006) relataram dano no tecido conjuntivo após 96 horas de exposição aguda ao endosulfan (1,0µg/L) no peixe bluegill *Lepomis macrochirus*. Compostos como endrin, DDT e endosulfan interferem nos processos de espermatogênese e ovogênese em muitas espécies, suprimindo a secreção de gonadotropinas, diminuindo a taxa de fertilidade o que pode gerar perigo potencial de extinção de numerosas famílias de peixes (HOAR et al., 1983).

Metais pesados também causam necrose testicular, como relatado por YAMAGUCHI et al. (2007) em *Pangasianodon hypophthalmus* que, quando expostos a molibdênio, apresentaram necrose testicular. Exposições crônicas ao cádmio geram inibição da espermatogênese em truta e em guppy (BILLARD, 1977). Outros poluentes ambientais, como os derivados do petróleo, também causam dano testicular, uma vez que a exposição crônica a óleo cru causa regressão parcial do testículo em *Tautoglabrus adspersus*, além de efeitos adversos na reprodução de peixes (HOAR et al., 1983).

Além das alterações já mencionadas no presente trabalho, se tem evidência de múltiplas alterações causadas por diferentes poluentes em relação ao sistema reprodutivo de teleósteos. NAZ (1999) descreve os efeitos do kepone, um inseticida clorado sintético, que atua sobre o metabolismo do cálcio, alterando fortemente a mobilidade e velocidade dos espermatozóides em *Atlantic croaker* expostos a águas contendo 1,0mM do produto durante 2 a 3 minutos. Esta exposição causou a diminuição em até 60% da mobilidade, comprometendo o sucesso da reprodução desta espécie. Este autor alerta sobre os riscos que trazem os efeitos tóxicos dos químicos sintéticos, chamados “disruptores endócrinos”, nas gônadas, na fertilidade e na função reprodutiva de mamíferos, peixes e, inclusive, em humanos. KEMADJOU (2002) relata alterações similares em peixe-zebra (*Brachydanio rerio*) quando expostos a concentrações de 5-

50µg/L de DDT. Depois de um mês de exposição foi observado efeito negativo no número e na velocidade do movimento dos espermatozóides destes peixes quando comparados com seus respectivos grupos-controle.

Durante o metabolismo de xenobióticos há formação de radicais livres que são eliminados pelas enzimas antioxidantes. A catalase é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio molecular. Além de seu papel como espécie reativa de oxigênio e causadora de estresse oxidativo, o H₂O₂, em excesso causa oxidação da hemoglobina e, conseqüentemente, diminuição das concentrações de oxigênio, gerando infecções, úlceras e até necroses nos organismos (CLAIBORNE, 1985; SAINT-DENIS et al., 1999).

Segundo JAISWAL et al. (2005), os pesticidas podem produzir mudanças clastogênicas, mutagênicas e alterações bioquímicas de três formas possíveis: a biotransformação mediada por enzimas pode converter os pesticidas em radicais livres altamente reativos ou espécies reativas derivadas do oxigênio (ERDO), que causam dano no DNA através de reações em cadeia ou alquilação. (LOUTE & DIXON, 1973); as oxidases hiper-reativas geradas durante o metabolismo do pesticida induzem rupturas nas fibras do DNA e/ou dos cromossomos (CERUTTI et al., 1987; apud JAISWAL et al., 2005); e, finalmente, estas últimas podem também iniciar o processo de peroxidação dos lipídeos da membrana que por sua vez produzem efeitos citotóxicos e genotóxicos (WILD, 1975).

O mecanismo de peroxidação dos lipídeos como forma de dano celular concorda com o descrito por PEREIRA (2004b) que relata lesões celulares causadas por radicais livres, quando refere-se ao mecanismo de peroxidação em cadeia que afeta os lipídeos poliinsaturados e que pode levar a dano e morte celular.

Para JAISWAL et al. (2005), o dano causado pelo endossulfan pode ser prevenido e tratado com a utilização de antioxidantes. Segundo estes pesquisadores, a quantidade de dano oxidativo causado pelo endossulfan depende do início da taxa de oxidação (ATP disponível na célula), da concentração do oxidante (endossulfan ou outro agente lesivo), e da progressão da reação em cadeia. Para PEARSON et al. (1996), a capacidade do antioxidante para inibir o dano oxidativo depende da sua capacidade de eliminar radicais livres, da sua concentração local e da sua capacidade de interferir com o início na progressão da peroxidação lipídica.

Conclusões

Exposições agudas ao Thiodan[®] (endosulfan), em dose a partir de 0,5µg/L, com temperatura da água aproximada de 26°C, causam diminuição na população de células germinativas em testículo Tilápia nilótica que se encontram em estágio inicial de maturação.

Concentrações iguais ou superiores a 1,0µg/L, com temperaturas de 26°C, causam necrose parcial ou total do parênquima testicular, podendo ser uni ou bilateral, e comprometendo de modo direto o ciclo reprodutivo de tilápias nilóticas expostas de forma aguda ao endosulfan.

O efeito tóxico do Thiodan[®] no parênquima testicular foi dose-dependente. Incrementos de temperatura de até 1°C influenciam no efeito tóxico sobre a morfologia do testículo em tilápia nilótica.

Referências bibliográficas

- ABDALLA, A. A.; MACNABB, C. D. Acute and sublethal growth effects of unionized ammonia to Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. 1998. Disponível em: <<http://www.hep.pac.dfo-mpo.gc.ca/congress1998/nitrogen>>. Acessado em junho 2008.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura: uma revisão para peixes e camarões**. Florianópolis/SC. UFSC. 1997. 166p.
- BAYER. Disponível em: <<http://www.bayercropscience.com.au/cs/products/productdetail.asp?id=116>> Acessado em julho 2008
- BILLARD, R.; FORTER, A.; JALBERT, B.; BRETON, B. **Endocrine control of teleost reproductive cycle and its relation to external factors**. Academic Press. 35-45, 1977.
- BLOOMQUIST, J. R. Ion channel as targets for insecticides. **Annuals Reviews Entomology**, 41: 163-190, 1996.
- CAPKIN E, A.; ALTINOK, A.; KARAHAN, B. Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. **Chemosphere**, 64:1793-800, 2006.
- CENGIZ, E. İ.; ÜNLÜ, E.; BALCI, K. The histopathological effects of thiodan on the liver and gut of mosquito-fish, *Gambusia affinis*. **Journal of Environmental Science and Health**. part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes. 36:75-85, 2001.
- CERUTTI, P. A.; NYGAARD, O. F.; SIMIC, M. G. (Eds.). Anti-carcinogenesis and Radiation Protection, New York: Plenum. pp. 1-9. 1987. In: JAISWAL, A.; KUMAR, P.V.; SUDHEER, K.; MANJULA, S. D.; KRISHNANAND, B. R.; SHANBHAG, R.; UNNIKRISHNAN, M. K. 5-Aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. **Mutation Research**, 585:50-59, 2005.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ECO_HELP.htm - 30k> Help Informações Ecotoxicológicas. Acessado em outubro 2006.
- CLAIBORNE, A. Catalase activity. In: GREENWALD, R.A. (Ed), **Handbook of Methods for Oxygen Research**, p. 283-284, 1985.
- COUTINHO C. F.; TANIMOTO S. T.; GALLI, A.; ARBELLINI, G.; TAKAYAMA M.; AMARAL, R.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Revista de Ecotoxicologia e meio ambiente**, 15:65-72, 2005.
- DOWSON, R. J. An introduction to the principles of neurophysiology. **Pesticides**

- Science**, 8: 651-660, 1977.
- DUTTA, H. M.; MEIJERB, H. J. M. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. **Environmental Pollution**, 125: 355-360, 2003.
- DUTTA, H. M.; MISQUITA, D.; KHAN, S. The effects of endosulfan on the testes of bluegill fish, *Lepomis macrochirus*: a histopathological study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 52:149-56, 2006.
- EDWARDS, C. A. **Persistent pesticides in the environment**. 2.ed. U.S.A.: CRC Press, 170p. 1973.
- ETO, M. Biochemical mechanisms of insecticidal activities. In: **Chemistry of Plant Protection**, Berlin: Springer-Verlag. 6:67-68, 1990.
- GIUSI, G.; FACCILOLO, R. M.; ALÒ, R.; CARELLI, A.; MADEO, M.; BRANDMAY, R. P.; CANONACO, M. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. **Environmental Health Perspectives**, 113:1522-1530, 2005.
- HOAR, W. S.; RANDALL, D.J. **Fish physiology**. Academic Press. 1983
- JAISWAL, A.; KUMAR, P. V.; SUDHEER, K.; MANJULA, S. D.; KRISHNANAND, B. R.; SHANBHAG, R.; UNNIKRISHNAN, M. K. 5-Aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. **Mutation Research**, 585:50-59, 2005.
- JOHNSON, W. W.; FINLEY, M. T. 1980. Handbook of acute toxicity of chemicals to fish and aquatic invertebrates. Resource 137. Washington, DC:U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service. In: GIUSI, G. et al. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via distinct cerebral histamine receptor subtypes. **Environmental Health Perspectives**, 113:1522-1530, 2005.
- KEMADJOU, N.J.; MÜLLER, P. Alteration in sperm release from Zebrafish (*Brachydanio rerio*) exposed to DDT. **Journal of Health Science**, 48:404-411, 2002.
- KOTAKA, E. T.; ZAMBRONE, F. A. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas: ILSI Brasil; 2001.
- KUBITZA, F. Qualidade da água na produção de peixes. 3. ed. Jundiaí: F. Kubitza. p.97, 1999. In: SALARO, A. L.; YOSHIZO, W.; ZUANON, J. A. S; MOREIRA, D. Qualidade da água na criação de peixes. Belo Horizonte. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, 50:1-8, 2006.
- KUBITZA, F. Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. 1. ed. Jundiaí: F. Kubitza, p.285, 2000. In: SALARO, A. L.; YOSHIZO, W.; ZUANON, J. A. S; MOREIRA, D. Qualidade da água na criação de peixes. Belo Horizonte. **Cadernos**

Técnicos de Veterinária e Zootecnia, 50:1-8, 2006.

LOUTE, A. J.; DIXON, G. H. Kinetics of phosphorylation and dephosphorylation of testis histones and their possible role in determining chromosomal structure, *Nat. New. Biol.* 243:164-168, 1973. In JAISWAL, A.; KUMAR, P. V.; SUDHEER, K.; MANJULA, S. D.; KRISHNANAND, B. R.; SHANBHAG, R.; UNNIKRISHNAN, M. K. 5-Aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. **Mutation Research**, 585:50-59, 2005.

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*)**. UFMG. Belo Horizonte, 2000. 108p. (Tese, doutorado em Ciências Biológicas).

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Agrofit 98: Uso adequado de agrotóxicos**. Brasília: SDA/DDIV/CFA/FAEAB, 1998. CD-ROM.

MUSANHI, R. G. Influence of two organochloridepesticides, Thiodan and Lindane on survival of fingerlings of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. United Nations Development Program Food and Agriculture Organization of the United Nations. (FAO). Nigerian Institute for Oceanography and Marine Research. 1987.

NOWAK, B. Histological changes in gills induced by residues of endosulfan. **Aquatic Toxicology**, 23:65-82, 1992.

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

PEARSON, D. C.; HEUIL, D. J.; MEDDINGS, J. B. The anti-oxidant properties of 5-aminosalicylic acid, *Free Radic. Biol. Med.* 21:367-373, 1996. In: JAISWAL, A.; KUMAR, P.V.; SUDHEER, K.; MANJULA, S. D.; KRISHNANAND, B. R.; SHANBHAG, R.; UNNIKRISHNAN, M. K. 5-Aminosalicylic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. **Mutation Research**, 585:50-59, 2005.

PEREIRA, F. E. L. Degenerações. Morte celular. Alterações do interstício. In: BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3:44-82, 2004a.

PEREIRA, F. E. L. Etiopatogênese geral das lesões. In: BRASILEIRO-FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 3:22-43, 2004b.

PINHEIRO, S., NARS, N. Y, LUZ, D. Agricultura Ecológica e a Máfia dos Agrotóxicos no Brasil. Rio de Janeiro: Edição dos Autores, 1998. Em: AZEVEDO, A. A. Análise dos Impactos Ambientais da Atividade Agropecuária no Cerrado e suas inter-relações com os Recursos Hídricos na Região do Pantanal. Disponível em: < assets.wwf.org.br/ > Acessado em dezembro 2006.

NAZ, R K. **Endocrine disruptors: effects on male and female reproductive systems**. CRC Press. p.358. 1999. Disponível em: <

<http://books.google.com/books?id=1noiRrMQPZ8C&lr=&hl=pt-BR&source=gbssummarys&cad=0> > Acessado em junho 2008.

ROSA, A.V. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo, p.10-17, 52-63. 1998.

RÜEGG, E. F.; PUGA, F. R.; SOUZA, M. C. M.; ÚNGARO, M. T. S.; FERREIRA, M. S.; YOKOMIZO, Y.; LMEIDA, W. F. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. In: MARTINE, G. & GARCIA, R. C. (Eds.). **Os impactos sociais da modernização agrícola**. São Paulo: Ed.Caetés, p.171-207. 1987.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SHINHA HIKIM, .A.P; CLEGG, E.D. **Histological and histopatological evaluation of the testis**. Bolesta: Cache River Press. Cap. 1, p. 1-38, 1990.

SAEG; Sistema para Análises Estatísticas, UFV: Central de processamento de dados. Viçosa/MG. 1999.

SAINT-DENIS, M.; NARBONNE, J. F.; ARNAUD, C.; THYBAUD, E.; RIBERA, D. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of benzo(a)pyrene. **Soil Biology and Biochemistry**, 31:1837-1846, 1999.

SALARO, A. L.; YOSHIZO, W.; ZUANON, J. A. S; MOREIRA, D. Qualidade da água na criação de peixes. Belo Horizonte. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**, 50:1-8, 2006.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H.; MORENO, S. Q. Variação dos parâmetros limnológicos em um viveiro de piscicultura nos períodos de seca e chuva. **Revista UNIMAR**, 16:229-242. 1994.

SIEGEL, J. M.; NIENHUIS, R.; GULYIANI, S.; OUYANG, S.; MIGNOT, E. Neuronal degeneration in canine narcolepsy. *Journal of Neuroscience*, 19:248-257, 1999. In: GIUSI, G.; FACCILOLO, R. M.; ALÒ, R.; CARELLI, A.; MADEO, M.; BRANDMAY, R. P.; CANONACO, M. Some environmental contaminants influence motor and feeding behaviors in the Ornate wrasse (*Thalassoma pavo*) via Distinct Cerebral Histamine Receptor Subtypes. **Environmental Health Perspectives**, 113:1522-1530, 2005.

SINGH, S. K.; PANDEY, R. S. Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotrophins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. **Indian Journal of Experimental Biology**, 28:953-956, 1990.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, 19:1117 – 1127, 2003.

SWANN, L. A Fish Farmer's Guide to Understanding Water Quality. Department of Animal Sciences. Illinois-Indiana Sea Grant Program Purdue University. Disponível em: < <http://aquanic.org/publicat/state/il-in/as-503.htm> > Acessado em junho 2008.

- TOMITA R. Y.; BEYRUTH Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental, Instituto Biológico. **O Biológico**, São Paulo, 64:135-142, 2002. Disponível em < <http://www.geocities.com/~esabio/tomita.htm> > Acessado em junho 2008.
- WARE GW. An introduction to insecticides [monografia na Internet]. 4rd ed. University of Minnesota, 2004 Disponível em: <<http://ipmworld.umn.edu/chapters/ware.htm> > Acessado em junho 2008.
- WATANABE, W. O.; LOSORDO, T. M.; FITZSIMMONS, K.; HANLEY, F. Tilapia production system in the Americas: technological advances, trends, and challenges. **Reviews in Fisheries Science**, 384:465-598. 2002. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10641262>. > Acessado em dezembro 2007.
- WILD, D. Mutagenicity study on organophosphate pesticides, *Mutation Research*, 32:133–150, 1975. In: JAISWAL, A.; KUMAR, P. V.; SUDHEER, K.; MANJULA, S. D.; KRISHNANAND, B. R.; SHANBHAG, R.; UNNIKRIISHNAN, M. K. 5-Aminosalicyclic acid reverses endosulfan-induced testicular toxicity in male rats. **Mutation Research**, 585:50-59, 2005.
- YAMAGUCHI, S.; MIURA, C.; ITO, A.; AGUSA, T.; IWATA, H.; TANABE, S.; TUYEN, B. C.; MIURA, T. Effects of lead, molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at Mekong Delta area and *in vitro* experiment. **Aquatic Toxicology**, 83:43-51, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

A morfofisiologia reprodutiva de indivíduos jovens de tilápia nilótica é semelhante à de outros teleósteos já descritos na literatura. Testículos de tilápia nilótica jovem apresentam morfologia que se modifica rapidamente. À medida que o ciclo espermatogênico avança, aumentos de tamanho consideráveis são observados quando os animais entram no processo de proliferação de células germinativas, marcado principalmente por mitose de espermatogônias e células de Sertoli.

Animais da mesma idade podem se encontrar em fases diferentes da espermatogênese, tornando-se necessário a observação de dados biométricos como tamanho e peso para se aproximar à etapa de maturação real em que se encontra o peixe.

A fase proliferativa no processo de maturação sexual das tilápias nilóticas é um momento vulnerável aos efeitos adversos de tóxicos organoclorados que podem atingir e contaminar os corpos de água, afetando principalmente a proliferação de células germinativas do tipo G1, e causando lesões severas de necrose no parênquima testicular.

A contaminação de corpos de água doce com produtos organoclorados representa uma forte ameaça à reprodução de peixes teleósteos. A tilápia nilótica, mesmo sendo um animal que tem demonstrado boas condições de adaptação, não consegue fugir dos efeitos adversos do endossulfan sobre sua morfofisiologia reprodutiva, ainda que em concentrações menores que as já reportadas em alguns ecossistemas aquáticos após a aplicação deste produto nas culturas.

É importante a realização e divulgação deste tipo de trabalho para demonstrar até onde o uso irresponsável de agrotóxicos pode chegar, e quais seus efeitos sobre a biodiversidade e a preservação de espécies em nossos ecossistemas.

*Desconhecer a natureza é a
causa da desgraça humana.
Epicuro. 341-270 a.C.*