

DAIANE CRISTINA MARQUES DOS SANTOS

**TOXIDEZ AGUDA DO ZINCO EM LAMBARIS *Astyanax aff. bimaculatus*
(Linnaeus, 1758)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

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

T

S237t
2009

Santos, Daiane Cristina Marques dos, 1982-
Toxidez aguda do zinco em Lambaris
Astynax aff. *bimaculatus* (Linnaeus, 1758) / Daiane Cristina
Marques dos Santos. – Viçosa, MG, 2009.
xii, 111f.: il. col. ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Lambari (Peixe). 2. Testículos - Toxicologia. 3. Fígado -
Toxicologia. 4. Brânquias - Toxicologia. 5. Metais pesados.
6. *Astynax* aff. *bimaculatus*. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.




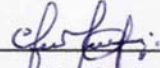

CDD 22.ed. 597.48

DAIANE CRISTINA MARQUES DOS SANTOS

**TOXIDEZ AGUDA DO ZINCO EM LAMBARIS *Astyanax aff. bimaculatus*
(Linnaeus, 1758)**

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

APROVADA: 18 de Fevereiro de 2009

 _____ Prof. Jorge Abdala Dergam dos Santos (Co-Orientador)	 _____ Prof. Juraci Alves de Oliveira (Co-Orientador)
 _____ Prof. Jener Alexandre Sampaio Zuanon	 _____ Prof. Oswaldo Pinto Ribeiro Filho
 _____ Prof. Sérgio Luis Pinto da Matta (Orientador)	

*“O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.”
Cora Coralina*

Dedico

Ao meu amor, que com sua dedicação e incentivo, tornou possível a realização deste estudo. Que acreditou em meus sonhos. Que compartilhou minhas alegrias e tristezas. Que com seu amor tornou minha vida verdadeiramente mais especial. Aos meus pais, pelo apoio incondicional, amor, carinho e atenção, em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês!

Ao professor Sérgio, orientador e amigo, por acreditar em mim e em meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por todo caminho percorrido, toda vitória alcançada e todos os obstáculos superados.

Ao meu pai, cujo exemplo de vida será sempre seguido por mim e o seu orgulho perante minhas vitórias será sempre um incentivo.

A minha mãe, por todas as suas palavras de conforto que sempre me tranquilizaram e me deram mais força para seguir em frente, por seu amor, carinho e dedicação incondicional.

Ao meu amor (Di), pelo seu companheirismo, a sua confiança e a sua enorme paciência que foram essenciais para conclusão deste curso e trabalho.

Aos meus irmãos e família, em especial a Mariana, pelo carinho e amor recebido que sempre será essencial.

Ao professor e amigo Sérgio Luis Pinto da Matta, por seu profissionalismo, pela sua orientação e a sua confiança nestes anos de convivência fizeram-me crescer e foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos meus co-orientadores, professores Jorge Abdala Dergam dos Santos e Juraci Aves de Oliveira, pelo incentivo e colaboração na realização deste trabalho.

Ao professor Laércio dos Anjos Benjamin pela contribuição e sugestões durante a realização do experimento.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Biologia Animal, pelos ensinamentos adquiridos durante o curso.

Aos Professores Oswaldo Pinto Ribeiro Filho e Jener Alexandre Sampaio Zuanon, que gentilmente participaram da minha banca de defesa e cujas sugestões engrandeceram este trabalho.

A piscicultura do Prata (Takinho), que gentilmente concedeu os animais para o experimento.

Aos Departamentos de Biologia Geral, Departamento de Medicina Veterinária, Departamento de Química, onde foram realizadas as atividades desse trabalho.

Ao laboratório de Anatomia Vegetal (Profa. Luzimar), por ceder espaço e equipamento para a obtenção das imagens.

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

Ao laboratorista Alex Bhering, do laboratório de Biologia Estrutural, Departamento de Biologia Geral, obrigada por todos os auxílios no laboratório e pela amizade.

Ao laboratorista Ricardo, do laboratório de espectrofotometria de absorção atômica do Departamento de Química, por todas as leituras no espectrofotômetro.

À grande Marli, amiga querida, pela colaboração durante a realização desse trabalho, pelas palavras de conforto e pelos sorrisos que sempre contagiam.

À Suellen, Ana Carolina pelo grupo de pesquisa que formamos no Projeto Piracicaba.

Aos amigos de disciplina e de laboratório, Marli, Su, Diane, Kaka, Carol, Bruninha, Kiki, Flávinha, Ju, Ana Paula (Ana Clara), Diego, Ana Tereza, Fabiana, Pamella, Fabíola, Priscila, Kenner, Mônica, Juliana, Reggiani, Danielle e Wellington pelo incentivo durante a jornada de trabalho.

Ao professor Dalmo, pela orientação concedida antes da inscrição no mestrado.

Aos meus Amigos, Cristina, Lucir, Magali, Cesar, Juliana, pessoas maravilhosas, com quem compartilho vitórias e tropeços.

Aos amigos da Biologia Animal, Cristiano, Marcelo, Roberto, Uedson, Néia, Fred, pelo companheirismo e amizade de fundamental importância para realização desse trabalho.

Aos amigos da Fruticultura, Luana, Danieele, Aline, Robson, Marcio (Tio Coca), Tiago, Matarazzo, Daniel, Cícero, Carlos Eduardo, Leonardo.

Muito Obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram e fizeram parte de mais essa etapa de minha vida.

BIOGRAFIA

Daiane Cristina Marques dos Santos, filha de Juraci Marques e Creuza Barbosa, nasceu na cidade de Umuarama, Paraná, em 15 de Janeiro de 1982.

No ano de 1997 iniciou o Curso Técnico em Agropecuária pela Escola Família Agrícola Pe. Ezequiel Ramim, no Estado de Rondônia. No ano de 1999 concluiu o ensino médio.

Em 2001 iniciou o Curso de Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela Universidade Paranaense – UNIPAR, na cidade de Umuarama, Estado do Paraná, graduando-se como Bacharel e Licenciada em Janeiro de 2005.

Em 2005 lecionou disciplinas de biologia e química para o ensino médio na Escola Estadual Princesa Isabel, de São Miguel do Guaporé, em Rondônia.

Em agosto de 2007 iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal pela Universidade Federal de Viçosa, defendendo a dissertação em 18 de fevereiro de 2009.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
INTRODUÇÃO GERAL	1
Metais pesados, contaminação dos ambientes aquáticos e acumulação nos organismos.....	2
Peixes como bioindicadores	5
Brânquias	6
Fígado.....	7
Testículos e espermatogênese	9
Considerações sobre <i>Astyanax aff. bimaculatus</i>	12
OBJETIVOS GERAIS	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
MATERIAL E MÉTODOS	14
Determinação da concentração do zinco nos peixes.....	15
Análises das brânquias	16

Análises do fígado.....	17
Análises dos testículos.....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
CAPÍTULO 1.....	30
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO ZINCO	30
RESUMO	30
INTRODUÇÃO	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
CAPÍTULO 2.....	56
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM FÍGADO DE <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO ZINCO	56
RESUMO	56
MATERIAL E MÉTODOS.....	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
CAPÍTULO 3.....	82
ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM TESTÍCULO DE <i>Astyanax aff. bimaculatus</i> CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO ZINCO	82
RESUMO	82
MATERIAL E MÉTODOS.....	87
RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
CONCLUSÕES	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	108
ANEXOS.....	109

RESUMO

SANTOS, Daiane Cristina Marques dos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2009. **Toxidez aguda do zinco em lambari *Astyanax aff. bimaculatus* (Linnaeus, 1758)**. Orientador: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Orientadores: Jorge Abdala Dergam dos Santos e Juraci Alves de Oliveira.

O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais tem causado diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos. Neste contexto, com este trabalho propõe-se estudar os efeitos da exposição aguda a diferentes concentrações de zinco na histologia de brânquias, fígado e testículo de indivíduos adultos de lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*). Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus* adultos divididos em cinco grupos de tratamentos e um grupo controle, com 12 repetições. Os tratamentos foram cinco concentrações de zinco: 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L na água. A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, laboratório de Morfofisiologia de Peixes. Após o tempo de exposição de 96 horas, os animais foram eutanasiados, pesados, medidos e retirado fragmentos de fígado, músculo, osso, brânquias e testículo. Partes desses tecidos foram fixadas e incluídas, seccionados em micrótomo rotativo e coradas para confecção de lâminas. O restante dos tecidos foi desidratado e digerido para quantificação da absorção do zinco. Durante o período experimental a água dos aquários apresentou-se com características físico-químicas dentro dos limites considerados aceitáveis para a espécie, em oxigênio dissolvido, pH, amônia tóxica, condutividade elétrica, dureza total e temperatura. Pôde-se estimar a CL50-96 horas na exposição aguda como sendo de 10 mg/L de zinco. O zinco mostrou-se altamente tóxico, em exposição aguda mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira, que é de 5 mg/L na água para a criação de animais. As alterações histopatológicas encontradas nas brânquias foram hiperplasia, fusão lamelar, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, ruptura de membrana, deleção do epitélio lamelar secundário, produção excessiva de muco sendo mais graves nos tratamentos expostos a maiores concentrações de zinco. As brânquias demonstraram ser um excelente indicador de contaminação ambiental para Zn, por estarem em contato direto com a água e ser muito

permeável para atender as trocas gasosas com o meio externo. As alterações histopatológicas encontrados no fígado foram congestão vascular, diminuição do volume celular, deslocamento de núcleo do hepatócito, necrose, desarranjo da estrutura cordonal, infiltrado leucocitário e vacuolização, sendo mais graves nos tratamentos expostos às maiores concentrações de zinco. O aumento da concentração de zinco na água comprometeu as funções fisiológicas do fígado. O aumento do número de hepatócitos pode ser considerado um mecanismo compensatório para o restabelecimento da homeostase frente a poluentes ambientais. As principais alterações evidenciadas nas gônadas expostas ao zinco foram ruptura de cisto, retardo no desenvolvimento das células da linhagem germinativa, núcleo picnótico, aglomerado celular, descolamento da parede dos cistos, vacuolização. O zinco comprometeu as funções reprodutivas da espécie em estudo, sendo mais graves nos tratamentos expostos a maiores concentrações deste metal, em especial no retardo do desenvolvimento dos cistos, levando à redução na produção de espermatozoides, podendo comprometer a taxa de fecundidade e conseqüentemente na manutenção dos estoques populacionais.

ABSTRACT

SANTOS, Daiane Cristina Marques dos, M.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February, 2009. **Acute toxicity of zinc in “lambari” (*Astyanax aff. bimaculatus*) (LINNAEUS, 1758)**. Adviser: Sérgio Luis P. da Matta. Co-Advisers: Jorge Abdala Dergam dos Santos and Juraci Alves de Oliveira.

The increase of contamination levels in aquatic ecosystems causes morphological, physiological and biochemical alterations in aquatic organisms. In this context, this paper proposes to study the acute effects of different zinc (Zn) concentration levels on gills, liver and testis histology in *Astyanax aff. bimaculatus*. The experimental design involved seventy-two adult males separated in five treatments and a control group, with 12 replications was performed using 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L of water. After an exposure of 96 hours, the animals were euthanized, measured and weighted, and fragments of liver, muscle, bone, gills, and testes were collected. Part of this material was used for standard histological techniques and the remaining tissues were dehydrated and digested for quantification of zinc absorption. During the experiment, all water abiotic parameters (dissolved oxygen, pH, toxic ammonia, electrical conductivity, hardness and temperature) varied within acceptable levels for this species. Lethal zinc concentration (CL) 50-96 hours of acute exposition was characterized as 10 mg/L. Zinc was considered as highly toxic in acute exposure, even at the Brazilian legal concentration, which is 5 mg/L in water to rearing animals. The histopathological changes found on the gills were hyperplasia, lamellar fusion, aneurism, destruction of lamellar epithelium, membrane rupture, and deletion of secondary lamella, and increase on mucus production were more remarkable in treatments exposed to higher zinc concentrations. The gills were an excellent indicator of the environmental contamination for Zn, because they are in direct contact with water, and the greater permeability allows realizing gas exchange with the environment. In the liver, histological alterations were characterized as vascular congestion, reduction of cellular volume, change of the position of the hepatocyte nucleus, necrosis, and disarrangement of cordonal structure, leukocyte infiltrate, and vacuolization, being more severe in treatments exposed to higher

concentrations of zinc. The increased concentrations of zinc in water implicate the physiological functions of the liver. The number of hepatocytes may be a compensatory mechanism for the restoration of homeostasis against environmental pollutants. In the gonads, the main alterations were characterized as cyst rupture, delayed development of germ cell line, pyknotic nuclei, cellular conglomerate, detachment of cyst walls and vacuole formation. Zinc affected the reproductive functions of the species under study, being more severe in treatments exposed to higher concentrations of this metal, especially in delayed development of cysts, rising to reduction in the production of sperm and may impair the fertility rate and consequently the maintenance population stocks.

INTRODUÇÃO GERAL

A poluição ambiental é um dos fatores mais importantes da limitação ecológica, que corresponde a qualquer fator que tende a baixar o potencial de crescimento em um ecossistema, sendo que os metais pesados constituem o grupo principal de poluentes com efeitos danosos em organismos (ODUM, 1986). Com tanta interferência antrópica na natureza, a poluição e a contaminação do ambiente reflete diretamente na carga de efluentes lançados no ar, na água e nos solos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

O ecossistema aquático é considerado o mais suscetível à poluição. A poluição aquática está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas e pode ocorrer de forma intencional ou acidental, a partir de fontes naturais ou em decorrência da atividade humana (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). Entretanto, os metais pesados podem também estar presentes nos sistemas aquáticos como resultado de processos naturais, como intemperismo, erosão e erupções vulcânicas (MACHADO *et al.*, 2005).

Devido a todo esse processo dinâmico de transporte e redistribuição dos metais nas diferentes fases, concentrações aparentemente baixas na coluna d'água e nos sedimentos, podem ser potencialmente disponíveis para acúmulo nos organismos, tornando-se eventualmente tóxicas. O processo de biomagnificação de metais pesados é uma das formas pelas quais estes elementos atingem altas concentrações na biota, uma vez que os níveis de alguns metais aumentam progressivamente ao longo da cadeia alimentar, atingindo níveis elevados nos organismos predadores que ocupam o topo da cadeia trófica (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008). A absorção de metais como zinco e cobre pode ocorrer diretamente através da água ou indiretamente através da cadeia alimentar (HAMILTON *et al.*, 1998).

As brânquias e o fígado são órgãos vitais para os peixes, por estarem relacionados com respiração e osmorregulação, metabolismo dos xenobióticos, excreção e manutenção da homeostase dos fluidos corporais. Portanto, alterações nestes órgãos comprometem o funcionamento normal do organismo

e podem ser utilizadas para o monitoramento ambiental (SCHWAIGER, 2001; GERNHOFER *et al.*, 2001).

Poluentes aquáticos também podem influenciar negativamente na reprodução de peixes. Além disso, os efeitos subletais deixam peixes juvenis e adultos menos capazes de tolerar outros agentes estressantes, como baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água (MULLER; LLOYD, 1994).

Metais pesados, contaminação dos ambientes aquáticos e acumulação nos organismos

Os metais pesados são elementos químicos (metais e alguns semi-metais) que possuem densidade superior a 5 g/cm^3 (BAIRD, 1998). A maioria destes apresenta potencial tóxico comprovado, ou seja, são capazes de induzir efeitos deletérios aos organismos vivos expostos a eles (DALLINGER; RAIMBOW, 1993). Alguns metais pesados como cobre, ferro, zinco e cobalto são considerados elementos essenciais aos processos biológicos, mas podem ser tóxicos quando em concentrações mais elevadas (HEATH, 1995).

Esses metais têm despertado grande interesse em estudos ambientais, principalmente pelo fato de não serem biodegradáveis. Isso faz com que permaneçam em ciclos biogeoquímicos globais, sendo o das águas o seu principal meio de condução, podendo haver acumulação na biota aquática, em níveis significativamente elevados (SILVA, 2002).

A atividade industrial de mineração, o processamento de metais e a geração de despejos industriais e domésticos vêm contribuindo para o aumento da concentração de diversos metais pesados nos ambientes (ABEL, 1989). Os organismos vivos podem acumular metais pesados, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos (VIARENGO, 1989).

Diferenças na acumulação de metais dependem da sua biodisponibilidade, do seu metabolismo e da sua eliminação pelo organismo alvo (DEVILLER *et al.*, 2005). Peixes podem acumular grandes quantidades de metais em seus tecidos, já que algumas espécies são geralmente consideradas o topo da cadeia alimentar aquática (MANSOUR; SIDKY, 2002). A absorção de

metais, como cobre e zinco, podem ocorrer através das brânquias, trato gastrointestinal e revestimento epitelial, entre outros órgãos (SCHLENK; BENSON, 2001).

Segundo Rand e Petrocelli (1985), estudos em toxicologia aquática podem ser qualitativos e quantitativos em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos podem incluir tanto a letalidade e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução e respostas farmacocinéticas, patológicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. A toxicologia aquática também está relacionada com as concentrações dos agentes químicos que podem ocorrer no ambiente aquático (água, sedimento ou alimento). A toxicidade de um composto químico depende da exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e de fatores ambientais. A exposição é o contato/reação entre o organismo e o composto químico, sendo que os fatores mais importantes relacionados à exposição são: o tipo, duração e frequência da exposição e a concentração do agente químico. Os compostos hidrossolúveis estão mais prontamente disponíveis aos organismos do que aqueles mais lipofílicos, que estarão mais fortemente adsorvidos ou ligados à partículas em suspensão, matéria orgânica ou sistemas biológicos. Assim, os agentes químicos mais hidrossolúveis podem penetrar num organismo através de toda a superfície do corpo, brânquias e boca, enquanto os mais lipofílicos têm que ser ingeridos e absorvidos através do trato gastrointestinal.

Com relação à duração e a frequência da exposição dos organismos ao agente químico, Rand e Petrocelli (1985) afirmaram que na exposição aguda, os organismos entram em contato com o composto químico num evento único ou em eventos múltiplos que ocorrem num pequeno período de tempo, geralmente variando de horas a dias. Nas exposições agudas, onde o agente químico é rapidamente absorvido, geralmente os efeitos são imediatos, embora seja possível a produção de efeitos retardados similares àqueles resultantes de exposição crônica. Na exposição crônica, geralmente os organismos são expostos a baixas concentrações do agente tóxico que é liberado continuamente, ou com alguma periodicidade, num longo período de tempo (semanas, meses ou anos). Exposição crônica a compostos químicos pode

também induzir a efeitos rápidos e imediatos, como os efeitos agudos, em adição aos efeitos que se desenvolvem lentamente.

A frequência de exposição também afeta a toxicidade dos compostos químicos. Uma exposição aguda pode resultar num efeito adverso imediato num organismo, enquanto duas exposições sucessivas, com que a soma equivale à exposição aguda única podem não ter efeito ou este ser pequeno, devido ao metabolismo (desintoxicação) do composto químico pelo organismo entre as exposições ou à adaptação do organismo ao composto. Organismos estressados em função de exposição prévia a outras substâncias tóxicas também podem ser mais suscetíveis aos compostos químicos, cenário comum na realidade dos ecossistemas, pois normalmente há a presença simultânea de diferentes produtos (RAND; PETROCELLI, 1985).

Os fatores bióticos e abióticos podem, também, alterar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático. Os fatores bióticos incluem o tipo de organismo (alga, inseto ou peixe), estágio de desenvolvimento (larva, juvenil, adulto), tamanho, estado nutricional e de saúde, alterações sazonais no estado fisiológico. Os fatores abióticos que podem atuar modificando a toxicidade do composto químico incluem todas as características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo, como a temperatura, o pH, o teor de oxigênio dissolvido na água, a salinidade e a dureza, conteúdo de matéria orgânica e material particulado em suspensão, a velocidade do fluxo da água, dentre outros (SPRAGUE, 1985).

Barak e Manson (1990) coletaram cinco espécies de peixes em um rio no leste da Inglaterra e avaliaram as concentrações de mercúrio, cádmio e chumbo no fígado e músculo destas espécies. Os níveis de mercúrio no músculo de todas as espécies foram duas vezes maiores que no fígado, mas para cádmio e chumbo, os níveis foram maiores no fígado que no músculo, sendo que as concentrações dos metais variaram entre as espécies.

Foram analisados a presença de zinco, cobre, cádmio, chumbo em músculo de truta (*Salmo trutta*) capturadas no rio Turia (Espanha), sendo que zinco e cobre apresentaram-se em níveis significativos nas amostras e o zinco foi o metal que apresentou maiores concentrações, seguido pelo cobre (BORDAJANDI *et al.*, 2003). Foram coletados no lago Pamvotis (Grécia),

quatro espécies de peixes e analisaram as concentrações de cobre e zinco, no fígado, músculo e gônadas. Estes tecidos apresentaram concentrações significativas dos metais, sendo que o fígado apresentou maior acúmulo, seguido por gônadas e músculo. As diferenças observadas nas concentrações dos metais, nas diferentes espécies, foram devido à ação de algumas variáveis como habitat, variações sazonais e afinidade individual para absorção do metal (PAPAGIANNIS *et al.*, 2004).

Foram verificados acúmulo de cádmio, cobre e zinco em tecidos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em um experimento de exposição crônica. Neste estudo foi observado acúmulo significativo dos metais nas brânquias, fígado e rins dos peixes expostos, quando comparados aos controles (MCGEER *et al.*, 2000). Por outro lado, Romani *et al.*, (2003) expuseram a espécie dourada (*Sparus auratus*) a concentrações subletais de cobre e não verificaram acúmulo do metal nos tecidos cerebral e muscular.

A concentração corporal de metais em diferentes organismos, como peixes, pode propiciar importantes informações principalmente se uma clara relação existir entre acúmulo de metais e os efeitos tóxicos dos mesmos (BORGSMANN, 2000).

Peixes como bioindicadores

Bioindicadores são definidos como uma espécie capaz de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental causado por contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (ADAMS, 2002).

O uso de bioindicadores na avaliação da toxicidade de compostos químicos de origem antrópica em áreas impactadas vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

Quando peixes e outros organismos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser dramáticos. No caso de poluição severa pode haver mortalidade quase instantânea. Longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em prejuízos bastante visíveis. Por outro lado, a curta exposição a estressores ambientais pode

resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (JOBILING, 1995).

É muito comum a utilização de invertebrados no monitoramento ambiental por serem componentes majoritários dos ecossistemas e apresentarem abundância populacional (PÉQUEUX, 1995). Porém é crescente o número de trabalhos onde peixes são empregados como bioindicadores da qualidade dos ecossistemas aquáticos (PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; BARCAROLLI; MARTINEZ, 2004) embora ainda sejam poucos os trabalhos com espécies neotropicais. Os peixes ocupam os mais diversos ambientes aquáticos (VAZZOLER, 1996; LOWE-MC CONNELL, 1999) e são de grande importância comercial, já que fazem parte da dieta em muitos países e, em vários outros são a principal fonte de proteínas da população (SILVA FILHO *et al.*, 2000).

Brânquias

As brânquias são órgãos alvo da ação de poluentes em peixes, por estarem em contato permanente com o ambiente aquático e apresentarem uma área superficial muito grande, representada pelas lamelas secundárias (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDŽIC, 1994).

As brânquias exercem funções vitais nos teleósteos, tais como respiração, osmorregulação e excreção. Constituem ainda o sítio de tomada e depuração de contaminantes e o local onde a desintoxicação e o metabolismo de agentes tóxicos podem ocorrer. A presença de poluentes na água pode induzir alterações morfológicas e conseqüentemente, estas alterações podem ser utilizadas como parâmetros para o monitoramento ambiental (PACHECO; SANTOS, 2002; VEIGA *et al.*, 2002; MELETTI *et al.*, 2003).

As brânquias dos peixes teleósteos são constituídas por quatro arcos branquiais em cada lado da faringe. De cada arco branquial estendem-se duas fileiras de filamentos branquiais ou lamelas primárias, e acima e abaixo destes filamentos, em intervalos regulares, elevam-se as lamelas secundárias que são sítios de trocas gasosas. Cada lamela secundária é constituída por células pavimentosas, apoiadas na membrana basal, que revestem as células pilares.

As células pilares possuem prolongamentos que, em contato com os prolongamentos das células pilares adjacentes, formam espaços por onde circula o sangue (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Em contraste com as células pavimentosas, as células ricas em mitocôndrias ocupam uma fração muito menor da área de superfície do epitélio branquial, mas são considerados locais primários de ocorrência de processos fisiológicos ativos nas brânquias (EVANS *et al.*, 2005).

Fígado

O fígado é um órgão chave quando se considera a ação dos poluentes químicos sobre o peixe. É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e provavelmente também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros xenobióticos se acumulam no fígado, de modo que as células hepáticas ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes, no ambiente ou em outros órgãos do peixe (HEATH, 1987).

O fígado de peixes teleósteos tem um considerável volume em relação ao corpo. É de cor marrom nas espécies livres e carnívoras, e marrom claro nas espécies herbívoras, mas em certos períodos do ano pode apresentar cor amarela e inclusive esbranquiçada. É composto por dois lobos: o lobo direito que está ao lado da vesícula biliar e o lobo esquerdo próximo ao baço (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995).

O fígado situa-se na porção anterior da cavidade celomática, sendo que em algumas espécies se estende ao longo dessa cavidade, ou está estreitamente unido a outras vísceras. Em outras espécies de peixes, é um órgão compacto que se combina com o pâncreas formando o hepatopâncreas, sendo que as células do pâncreas exócrino (pâncreas intra-hepático) encontram-se distribuídas pelo parênquima hepático ao longo da veia porta. Em outras espécies, o fígado se encontra completamente separado do pâncreas (ARANA, 1995; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). É composto de células parenquimatosas (células hepáticas ou hepatócitos) e uma rede de fibras cuja função é de suportar os elementos celulares. A superfície do fígado é envolvida

por membrana serosa, e alguns septos do tecido conjuntivo dessa cápsula se estendem para o interior do parênquima (GARTNER; HIATT, 2007).

O hepatócito tem forma poligonal contendo um núcleo central esférico claramente visível (ROBERTS, 1981; VERLAG, 1982), embora células binucleadas possam ser observadas. O núcleo está localizado na região central ou no pólo celular voltado para o capilar sinusóide (ARANA, 1995) e usualmente possui um nucléolo bem evidente. Grande quantidade de material nutritivo como lipídeos e glicogênio é armazenada no citoplasma das células hepáticas como produtos de reserva, sendo liberados para o sangue como fonte de energia, quando necessário (GARTNER; HIATT, 2007). As células hepáticas são responsáveis por diversas funções essenciais para a sobrevivência da espécie. Realizam importante papel no metabolismo de proteínas, lipídeos e carboidratos. Servem como sítios de armazenamento para muitos nutrientes, como a glicose e desintoxicam o organismo. Além disso, estão envolvidas na hematopoese durante a vida larval e na secreção da bile (KUMAR; ANSARI, 1986).

Devido à sua função no metabolismo de xenobióticos e sua sensibilidade a poluentes ambientais, o fígado tem recebido atenção especial em estudos toxicológicos relacionados à contaminação de diferentes espécies de peixes, por agentes químicos orgânicos e inorgânicos (HINTON *et al.*, 1992). Assim, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992; GUNDERSEN *et al.*, 2000). Na presença de poluentes, o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócitos que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos de contaminantes (HINTON *et al.*, 1992; PARIS-PALÁCIOS *et al.*, 2000; SCHWAIGER, 2001; PACHECO; SANTOS, 2002; THOPHON *et al.*, 2003; FANTA *et al.*, 2003).

A poluição da água é capaz de induzir alterações histológicas no fígado, as quais podem causar disfunções metabólicas em peixes (GÜL *et al.*, 2004).

Testículos e espermatogênese

Morfologicamente a reprodução envolve o desenvolvimento das gônadas, desde o tecido embrionário até o estágio maduro, capazes de produzir hormônios e gametas viáveis, além da diferenciação das estruturas sexuais entre machos e fêmeas, sejam elas genéticas, hormonais ou ambientalmente determinadas, e a constituição de caracteres sexuais secundários, relacionados à corte, acasalamento ou ao cuidado com a prole (THAIN; HICKMAN, 1995).

Os testículos dos peixes estão localizados na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestório, ventralmente ao mesonefro e ventrolateralmente ao longo da bexiga gasosa, encontrando-se presos à parede celomática e à bexiga gasosa pelo mesórquio. Macroscopicamente, os testículos da maioria dos teleósteos são órgãos pares, podendo estar parcial ou totalmente fundidos entre si, apresentam usualmente tamanho similar entre o direito e o esquerdo e são freqüentemente alongados, embora existam outras formas como lobulados e foliáceos (LE GAC; LOIR, 1999). Os lóbulos testiculares são preenchidos por túbulos seminíferos os quais apresentam paredes formadas por cistos que se apoiam na lâmina basal e que são revestidos por prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli (MATTA, 2000).

A organização básica do testículo é comum a todos os peixes ósseos e aos anfíbios. Este órgão tem as funções espermatogênica e androgênica, possuindo dois compartimentos principais: o intersticial e o 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 andrógenos é importante para a diferenciação sexual, o desenvolvimento das características sexuais secundárias e 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 um processo bastante complexo e altamente organizado, a espermatogênese (BILLARD, 1990; KOULISH *et al.*,

2002). Unidas entre si por complexos juncionais especializados, as células de Sertoli dos teleósteos delimitam física e funcionalmente um clone de células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento que têm origem a partir de uma única espermatogônia primária, formando, assim, os espermatocistos ou cisto espermatogênico. 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 originados da espermiogênese (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 (PUDNEY, 1995; LE GAC; 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, 1984).

Exceto pelo arranjo cístico, no qual as células germinativas se desenvolvem de forma sincronizada, provavelmente devido à presença de pontes intercelulares (RUSSELL *et al.*, 1990; KOULISH *et al.*, 2002), o processo espermatogênico de teleósteos assemelha-se muito ao de mamíferos. Durante a fase proliferativa ou espermatogonial, a espermatogônia primária ou tipo A se divide e origina espermatogônias secundárias ou do tipo B que, depois de um número de divisões mitóticas que varia entre as espécies, originam os espermatócitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária. Após a primeira divisão meiótica formam-se os espermatócitos secundários haplóides que, num curto intervalo de tempo, originam as espermátides através da segunda divisão meiótica. Em seguida, ocorre a fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as espermátides se transformam em espermatozóides (SILVA, 1987). 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). 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 (VILELA *et al.*, 2003).

Nos machos adultos de bagre-africano (*Clarias gariepinus*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*), à medida que o volume dos cistos espermatogênicos 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; RUSSELL, 1998; SCHULZ *et al.*, 2005).

Considerando-se o número de espécies de peixes, existem poucos relatos na literatura a respeito da duração dos eventos espermatogênicos nestes vertebrados. No entanto, pode ser evidenciado que, de maneira geral, a duração da espermatogênese em peixes é bem mais rápida do que o observado para mamíferos (SILVA; GODINHO, 1983; KOULISH *et al.*, 2002; FRANÇA *et al.*, 2002; VILELA *et al.*, 2003).

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).

O fato de os peixes serem animais ectotérmicos (cuja temperatura geralmente está um pouco acima da temperatura ambiente) provavelmente faz com que a duração dos eventos espermatogênicos varie de acordo com a temperatura, sendo mais rápidos em temperaturas mais elevadas (FRANÇA *et al.*, 2002; VILELA *et al.*, 2003).

Concentrações elevadas de zinco inibem a divisão e replicação das células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e do núcleo (FAHIM *et al.*, 1993; BLOOMBERG, 1996). Ratos machos submetidos à dietas suplementadas com zinco tiveram a atividade de enzimas dos tecidos do trato reprodutor reduzidas. Na avaliação histológica das gônadas foram observados atraso da meiose do espermátócito primário e degeneração dos espermátócitos

secundários, acúmulo de líquido no túbulo seminífero e redução na altura do epitélio celular do epidídimo (SAXENA *et al.*, 1989).

Considerações sobre *Astyanax aff. bimaculatus*

O lambari, *A. aff. bimaculatus*, pertence à família Characidae, anteriormente considerada como parte da subfamília Tetragonopterinae (BRITSKI, 1972). Hoje esta espécie é considerada como "incertae sedis" dentro dos Characidae (LIMA *et al.*, 2003). Os representantes de distribuição mais ampla deste gênero são os lambaris-de-rabo-vermelho (*A. fasciatus*) e os lambaris-de-rabo-amarelo (*A. aff. bimaculatus*) (ARAÚJO; SIMONI, 1997). Provavelmente, ambas "espécies" devam ser consideradas como grupos de espécies que partilham algumas características de fácil identificação (Dergam, com. pess.). Os lambaris são conhecidos também por tambiu, piabas no Nordeste e matupiris no Norte. Possuem distribuição desde o Nordeste brasileiro até a bacia do Prata, além de destacada importância econômica, dado o seu volume de captura e destaque na pesca esportiva (BARBIERI *et al.*, 1982).

Pode atingir 10,9 cm e 42 g (IHERING; AZEVEDO, 1936) e, dependendo das condições ambientais, pode apresentar desova parcelada ou total (IHERING; AZEVEDO, 1936; NOMURA, 1975; GARUTTI, 1989; GENNARI FILHO; BRAGA, 1996). Possui de quatro a cinco dentes na série externa e cinco na interna do pré-maxilar. O corpo é alto e o dorso é castanho-escuro, com uma mancha umeral bilateral negra ovalada e de limites bem distintos. Apresenta faixa lateral prateada ou escura, ao longo do flanco, até a mancha do fim do pedúnculo caudal, que continua até a ponta dos raios caudais medianos. As nadadeiras ventral e a caudal são amarelas (BRITSKI *et al.*, 1984; CEMIG/CETEC, 2000).

É encontrado em grande variedade de ambientes, como cabeceiras de riachos, rios, lagos e brejos, onde é facilmente pescado. Muito ativo, move-se em cardumes e pode realizar curtas migrações ascendentes na época das cheias, o que lhe proporciona o estímulo necessário para a reprodução. A atividade reprodutiva nesta espécie inicia-se a partir dos 5 cm de comprimento.

Em alguns tributários do Rio Grande este peixe pode reproduzir durante o ano todo. Isto demonstra que a espécie tem uma alta capacidade reprodutiva, variando de acordo com o ambiente em que vive. Um caráter sexual do macho é aspereza mais ou menos acentuada da nadadeira anal, resultando de inúmeras espículas, que aparecem na época da reprodução. Em geral, o macho é menor que a fêmea (CEMIG/CETEC, 2000).

Em estudos realizados no rio Mogi-Guaçu, SP, definiu-se *A. aff. bimaculatus* como onívoro, com predominância de consumo de restos de vegetais superiores (NOMURA, 1975). A espécie apresenta tendência à herbivoria-insetivoria, refletindo uma característica oportunista (SILVA, 1998).

O lambari é um ótimo organismo experimental, devido à facilidade de obtenção e de manutenção em condições laboratoriais, por ser uma espécie nativa de grande interesse comercial e muito abundante nos rios de regiões brasileiras.

Assim, devido à diversidade de ambientes em que se encontra a espécie, e também às suas características reprodutivas, que representam o comportamento de grande parte dos teleósteos, o estudo da espermatogênese da espécie em exposição ao zinco, pode ser representativa dos peixes neotropicais de pequeno porte, em regiões suscetíveis à contaminação por este metal.

OBJETIVOS GERAIS

Com o presente estudo objetivou-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de zinco, em exposição aguda, na histologia de brânquias, fígado e testículo de indivíduos adultos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*) e avaliar a espécie como bioindicador de qualidade de água.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estimar a toxicidade aguda (CL50 96h) do zinco para lambaris (*A. aff. bimaculatus*).

Determinar a concentração de zinco absorvida em brânquias, osso, músculo, testículo e fígado da espécie estudada, em diferentes concentrações de zinco na água.

Avaliar alterações histopatológicas em brânquias, fígado e testículo causadas pela exposição aguda a esse metal.

Avaliar os tecidos branquial, hepático e testicular como bioindicadores de qualidade de água.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob número 36/2008.

Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus*, colhidos aleatoriamente aos 70 dias pós-desova, na Piscicultura do Prata, Eugenópolis – MG, na bacia do rio Paraíba do Sul. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária, nos Laboratórios de Biologia Estrutural, Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal e de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Química, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados aquários de vidro, com capacidade de 150 L de água, livre de cloro (por evaporação), mantendo-se 12 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 L/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20 % do volume de água dos aquários era sifonado, para eliminar restos de matéria orgânica, e imediatamente substituída, mantendo-se as mesmas características iniciais. A qualidade da água foi monitorada a cada 24 horas, medindo-se o oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito através de kits colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH pelo medidor de pH digital portátil (Sammar 1700) e a condutividade elétrica pelo condutivímetro digital portátil (Tonka CD 840)

(Anexo 2 – Tabela 2). Os valores de pH e dureza total estão de acordo com o banco de dados publicados pela FishBase para a espécie (FISHBASE, 2009). Oxigênio dissolvido e condutividade elétrica de acordo com Oyokawa *et al.*, 2006, e amônia tóxica, com Kubitzka, 1999.

A temperatura foi controlada (26 ± 1 °C) (FISHBASE, 2009) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W). O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro controlados por temporizador. Os peixes tiveram alimentação diária “*ad libitum*” ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida em três vezes ao dia: às 8, 13 e 17 horas. Essa ração apresentava-se em grânulos de 4 mm e devido a incompatibilidade com o tamanho da cavidade bucal dos peixes, foi triturada e peneirada utilizando-se peneira com malha de 1 mm.

Os animais foram expostos a concentrações de 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L de zinco na água, fornecido na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Merck, n° de registro 1.08883.1000, lote A820983-821) e um grupo controle, durante 96 horas, em que cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 12 repetições.

Após a aplicação do tratamento, foram feitas observação a cada hora e os animais mortos nesse intervalo, foram retirados dos aquários, e submetidos aos mesmos procedimentos daqueles que sobreviveram até o final do tempo de exposição, com exceção da eutanásia. Ao final da exposição, os animais foram previamente anestesiados, com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia até serem eutanasiados. Procedeu-se, então, à pesagem, com balança analítica digital com precisão de 0.0001 g (Scientech, AS 210), medição com paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de 0,02 mm, e a retirada dos tecidos (tesoura e bisturi cirúrgico) para as análises histológicas e de concentração de zinco. Para a histologia das brânquias foram utilizados fragmentos do segundo arco braquial, regiões medianas, e para fígado e testículo regiões medianas dos órgãos.

Determinação da concentração do zinco nos peixes

Amostras de fragmentos de osso, testículo, fígado, brânquias e músculo, após pesagem em balança analítica digital com precisão de 0,0001 g (Scientech

AS 210) foram mantidas em estufa, a 70 °C, até alcançarem peso seco constante. As amostras pré-secas foram acondicionadas em erlenmeyer (25 mL), seguidas da adição de 1,5 mL de HNO₃ concentrado, 0,5 mL de HClO₄ 70 %, 2 gotas de água oxigenada 30 % e 1 gota de querosene para reduzir a formação de espuma. A temperatura do bloco digestor foi aumentada gradualmente, iniciando a 70 °C até atingir 90 °C, de forma que a digestão completa durasse cerca de 30 minutos. Após diluição do material digerido, procedeu-se à determinação das concentrações dos elementos minerais através do espectrofotômetro de absorção atômica (Shimadzu AA 6701).

Análises das brânquias

Após a incisão na região opercular com tesoura cirúrgica, as brânquias foram retiradas, e fragmentos do segundo arco braquial, região mediana, seguiram o mesmo processamento histológico descrito para os testículos e fígado. Após a inclusão, foram feitas secções semi-seriadas de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1 %, montadas com Entellan[®] (Merck) e analisadas sob microscopia de luz (microscópio Olympus BX-50). As imagens digitais foram capturadas por meio de fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal (UFV), e processadas utilizando o software Adobe Photoshop CS2[®].

Para as análises histológicas foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias utilizando-se 10 campos/animal: hiperplasia, fusão lamelar, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, ruptura de membrana, deleção do epitélio lamelar secundário e produção excessiva de muco. Se a patologia estivesse presente em pelo menos um dos campos visualizados, esta era considerada presente no animal. Ao final, foi feita uma relação entre os animais que apresentaram patologia e o total presente no tratamento (n=12), expressando-se assim o resultado em porcentagem.

Análises do fígado

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

Os fígados foram analisados morfometricamente contando-se pontos sobre: núcleo e citoplasma de hepatócitos, capilares sinusóides e infiltrados leucocitários com um total de 798 pontos/animal. Estas análises foram realizadas utilizando-se grade quadriculada (65x65) do programa Image Pro Plus. Foi medido também o diâmetro de 30 núcleos de hepatócitos por tratamento.

Para as análises histológicas foram qualificadas e quantificadas as patologias congestão vascular, diminuição do volume celular, deslocamento de núcleo do hepatócito, necrose, desarranjo da estrutura cordonal, infiltrado leucocitário e vacuolização. Se a patologia estivesse presente em pelo menos um dos campos visualizados, esta era considerada presente no animal. Ao final, foi feita uma relação entre os animais que apresentaram patologia e o total presente no tratamento (n=12), expressando-se assim o resultado em porcentagem.

Análises dos testículos

Após a incisão longitudinal ventral da parede celomática com tesoura cirúrgica, os testículos foram removidos, e fragmentos testiculares da região mediana foram fixados em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 4 % e

Paraformaldeído 4 %) por 24 horas e depois transferidos para álcool 70 %. Os fragmentos gonadais foram então colocados em série etanólica crescente (70 %, 80 %, 90 %, 95 % e 100 %), com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin[®], Leica). Após a inclusão, foram feitas secções seriadas de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045), utilizando-se navalhas de vidro. As preparações foram coradas com azul de toluidina e borato de sódio 1 %, montadas com Entellan[®] (Merck), e analisadas sob microscopia de luz (microscópio Olympus BX-50). As imagens digitais foram capturadas por meio de fotomicroscópio Olympus AX70 TRF, no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal (UFV), e processadas utilizando o software Adobe Photoshop CS2[®].

As gônadas foram analisadas morfológica e morfometricamente de acordo com Matta *et al.* (2002). Morfometricamente foram analisados quatro campos de proporção entre túbulo e intertúbulo, fluido testicular e espermatozóides por animal, com um total de 1976 pontos/animal. Estas análises foram realizadas utilizando-se grade quadriculada (60x60) do programa Image Pro Plus.

Para as análises histológicas foram qualificadas e quantificadas as patologias de ruptura de cisto, retardo no desenvolvimento dos cistos, células com núcleo picnótico, agrupamento celular, descolamento da parede dos túbulos e de vacuolização do epitélio germinativo, utilizando dez campos/animal. Se a patologia estivesse presente em pelo menos um dos campos visualizados, esta era considerada presente no animal. Ao final, foi feito uma relação entre os animais que apresentaram patologia e o total presente no tratamento (n=12), expressando-se assim o resultado em porcentagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P.D. **Water pollution biology**. Chichester: Ellis Howood, 1989. 328p.

ADAMS, M. (Eds). **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem stress**. Maryland: American Fisheries Society Bethesda, USA, 2002. 600p.

ARANA, S. Estrutura histológica do fígado de peixes. Jaboticabal: 1995. **Semana sobre histologia de peixes**, p. 39-41. Resumo.

ARAÚJO, F.G.; SIMONI, M.R.F. Relação peso-comprimento do lambari rabo vermelho (*Astyanax fasciatus paraybae*) e do lambari rabo amarelo (*Astyanax bimaculatus*) na represa de Ribeirão das Lajes, Rio de Janeiro. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.40, n.2, p.453-458, 1997.

BAIRD, C. **Environmental chemistry**. Freeman and Company, New York, 1998, 698p.

BARBIERI G.; SANTOS, M.V.R.; SANTOS, J.M. Época de reprodução peso/comprimento de duas espécies de *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.17, n.7, p.1057-1065, 1982.

BARAK, N.A.E.; MASON, C.F. Mercury, cadmium and lead concentrations in five species of freshwater fish from Eastern England. **The Science of the Total Environment**, v. 92, p.257-263, 1990.

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

BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. **Reproduction Nutrition Development**. v.26, p.877-920, 1986.

BILLARD, R. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING G.E. (ed). **Reproduction in the male**. Churchill Livingstone, 1990, p.183-212.

BILLARD, R. Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. **Cell and Tissue Research**. v.237, n.2, p.219-226, 1984.

BLOOMBERG, M.S. Surgical neutering and nonsurgical alternatives. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 208, p. 517-519, 1996.

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

BORGMANN, U. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. **Aquatic Ecosystem Health and Management**, v. 3, p.277-289, 2000.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo: sistemática. In: Comissão Inter Estadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **Poluição e piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca, 1972, p.79-108.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias**. BRASÍLIA: CAMARA DOS DEPUTADOS/CODEVASF, 1984. 128 p.

CEMIG/CETEC. **Guia ilustrado de peixes da bacia do Rio Grande**. Belo Horizonte, 2000, 144p.

DALLINGER, R.; RAIMBOW, P.S. **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. Boca Raton: Lewis publishers, 1993. 461p.

DEVILLER, G.; PALLUEL, O.; ALIAUME, C.; ASANTHI, H.; SANCHEZ, W.; FRANCO NAVA, M.A.; BLANCHETON, J.P.; CASELLAS, C. Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.61, p.89-97, 2005.

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological Reviews**. v.85, p.97-177, 2005.

FAHIM, M.S; WANG, M; SUTCU M.F.; FAHIN, Z.; WOUNGQUIST, R.S. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. **Contraception**, v.47, p.107-22, 1993.

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

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

FRANÇA L.R.; RUSSELL L.D. The testis of domestic animals. In: **Male Reproduction**. MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; REGADERA, J. (eds). Churchill Livingstone, Madrid, Spain, 1998, p.197-219.

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**; v.11, p.52-57, 2002.

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

GARUTTI, V. Contribuição ao conhecimento reprodutivo de *Astyanax bimaculatus* (Ostariophysi, Characidae), em cursos de água da bacia do rio Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.49, n.2, p.489-495, 1989.

GENNARI FILHO, O.; BRAGA, F.M.S. Fecundidade e desova de *Astyanax bimaculatus* e *A. schubarti* (Characidae, Tetragonopterinae) na represa de Barra Bonita, rio Piracicaba (SP). **Revista UNIMAR**, Maringá, v.18, n.2, p.241-254, 1996.

GERNHÖFER, M.; MÜLLER, E.; PAWERT, M.; SCHRAMM, M.; MÜLLER, E.; TRIEBSKORN, R.; Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. **Journal Aquatic Ecosystem Stress Recovery**. v.8, n.(3/4), 241-260, 2001.

GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, New York, v.30, p.605-609, 2004.

GUNDERSEN, D.T.; MILLER, R.; MISCHLER, A.; ELPERS, K.; MIMS, S.D. Biomarker response and health of polychlorinated biphenyl – and chlordane-contaminated paddlefish from the Ohio River Basin, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.19, n.9, p.2275-2285, 2000.

HAMILTON, D.P.; MALIK, D.S; SASTRY, K.V. Effects of zinc toxicity on biochemical composition of muscle and liver of murrel (*Channa punctatus*). **Environment International**. v.24, n.4, p.433-438, 1998.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Virginia: Lewis Publishers, 1995, 359p.

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

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A.; OKIHIRO, M.S. **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, p.155-208.

IHERING, R. VON; AZEVEDO, P. As piabas dos açudes nordestinos (Characidae, Tetragonopterinae). **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.7, p.75-110, 1936.

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

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

KUMAR, K.; ANSARI, B. A. Malathion toxicity: effect on the liver of the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Orlando, v.12, p.199–205, 1986.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press 1999, v.3, p.20-30.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; DA SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. Genera Incertae Sedis in Characidae. p.106. In: REIS, R.;

KULLANDER, S.O.; FERRARIS JR., C.J. (Eds.). **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre – RS, Edipucrs, 2003. 729p.

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

MACHADO, T.T.V; GADELHA, C.L.M; SILVA JR, W.R; DINIZ, F.E.G; COLARES, D.A; NEVES, A.F.J.F. Avaliação preliminar da presença de chumbo e cromo em mananciais do estado da Paraíba, utilizados em sistemas urbanos de abastecimento de água. **23º Congresso Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental**, 2005.

MANSOUR, S.A., SIDKY, M.M. Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. **Food Chemistry**, v.78, p.15-22, 2002.

MATTA, S.L.P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell number per cyst in fish: The tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Endocrinology**, v.143, n.3, p.970-978, 2002.

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

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

MELETTI, P.C.; ROCHA, O.; MARTINEZ, C.B.R. Avaliação da degradação ambiental na bacia do rio Mogi-Guaçu por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes. In: BRIGANTE, J.; ESPÍNDOLA, E.L.G. (Org.). **Limnologia Fluvial - Um Estudo no Rio Mogi-Guaçu**. São Carlos, 2003, p.149-180.

MIURA, T. Spermatogenic cycle in fish. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999. v.4, p.571-578.

MULLER, R.; LLOYD, R. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. **Fishing News Books**, 1994, 371p.

NOMURA, H. Fecundidade, maturação sexual e índice gônado-somático de lambari do gênero *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Osteichthyes, Characidae), relacionados com fatores ambientais. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v.35, n.4, p.775-798, 1975.

ODUM, Y. **Ecology**. vols. 1, 2. Peace, Moscow, v1 p. 328, v2 p. 376, 1986.

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

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p.331-347, 2002.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**. v.30, p.357-362, 2004.

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

PÉQUEUX, A. Osmotic regulation in crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, v.1, n.15, p.1-60, 1995.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDŽIC, V. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. In: MÜLLER, R.; LLOYD, R. **Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish**. Oxford: Fishing News Books, 1994. cap.30, p.339-352.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy research and technique**. v.6, p.459-497, 1995.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. Introduction. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R., **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere, 1985, p.1-28.

ROBERTS, R.J. **Patología de los peces**. Madrid: MundiPrensa Libros, 1981. 372 p.

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

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

SAXENA, R.; BEDWAL, R.S.; MATHUR, R.S. Zinc toxicity and male reproduction in rats: a histological and biochemical study. **Trace Elements in Medicine**, v.6, p.119-133, 1989.

SCHLENK, D.; BENSON, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. London, v.1, 2001.

SCHULZ, R.W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANCA, L.R.; VILELA DA, GODINHO, H.P. Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**. v.73, n.5, p.891-898, 2005.

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

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

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

SILVA, M.; GODINHO, H.P. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Sarotherodon niloticus*. **Archives d'Anatomic, Microscopic and Morphology Experiment**, v.72, p.231-237, 1983.

SILVA, M. **Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemotesticular da tilápia do Nilo,**

Oreochromis niloticus. 1987. 164p. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1987.

SILVA, M.R.C. **Estudos de sedimentos da bacia hidrográfica do Mogi-Guaçu, com ênfase na determinação de metais**. 2002. 113p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002.

SPRAGUE, J.B. Factors that modify toxicity. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R., (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere, p.124-163, 1985.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. 2. ed. Tokyo: Kodansha, 1995.

THAIN; M.; HICKMAN, M. **Penguin dictionary of biology**. Ed Penguin, Londres, p.664, 1995.

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

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EdUEM, 1996, 196p.

VEIGA, M.L.; RODRIGUES, E.L.; PACHECO, F.J.; RANZANI-PAIVA, M.J.T. Histopathologic changes in the kidney tissue of *Prochilodus lineatus Valenciennes*, 1836 (Characiformes, Prochilodontidae) induced by sublethal concentration of trichlorfon exposure. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.45, n.2, p.171-175, 2002.

VERLAG, G.F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.**
Tokyo: Kodansha, 1982, 147p.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences.** v.1, 295p., 1989.

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**, v.28, p.187-190, 2003.

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 - part A: Molecular & Integrative Physiology*, v.137, n.3, p.447-477, 2004.

ZAGATTO, P.A; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações.** 2ª Ed. São Carlos: Rima, 2008. 486p.

CAPÍTULO 1

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM BRÂNQUIAS DE *Astyanax aff. bimaculatus* CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO ZINCO

RESUMO

O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais tem causado diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos, sendo as brânquias dos peixes um órgão reconhecido como indicador da qualidade ambiental. Neste contexto, com este trabalho propôs-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de zinco na histologia de brânquias de lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*), após exposição aguda. Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus* adultos divididos em cinco grupos de tratamentos e grupo controle com 12 repetições. Os tratamentos foram cinco concentrações de zinco: 0, 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L de água. A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, laboratório de Morfofisiologia de Peixes. Após o tempo de exposição de 96 horas, os animais foram eutanasiados, pesados, medidos e retirado fragmentos de brânquias, músculos e ossos. Fragmentos de brânquias foram fixados e incluídos, seccionados em micrótomo rotativo e coradas para confecção de lâminas. Fragmentos de osso, músculos e brânquias foram desidratados e digeridos para quantificação da absorção do zinco. Durante o período experimental a água dos aquários apresentou-se com características físico-químicas dentro dos limites considerados aceitáveis para oxigênio dissolvido, pH, amônia tóxica, condutividade elétrica, dureza total e temperatura. Pôde-se estimar a CL50-96 horas na exposição aguda como sendo de 10 mg/L de zinco. O zinco mostrou-se altamente tóxico, durante a exposição aguda, mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira (5 mg/L na água para criação de animais). A exposição dos peixes ao metal provocou alterações histopatológicas branquiais possivelmente irreversíveis sendo que essas patologias, correlacionadas com o aumento da concentração, comprometeram sua função respiratória e causaram a morte dos peixes nas concentrações de 10, 15 e 20 mg/L de zinco. As alterações histopatológicas

encontradas nas brânquias foram hiperplasia, fusão lamelar, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, ruptura de membrana, deleção do epitélio lamelar secundário e produção excessiva de muco sendo mais graves nos tratamentos expostos às maiores concentrações de zinco. As brânquias demonstraram ser um excelente indicador de contaminação ambiental para Zn, por estarem em contato direto com a água e por sua constituição histológica, além da grande área de superfície e alta permeabilidade, relacionada com as trocas gasosas.

PALAVRAS-CHAVE: Toxicologia; lambaris; metal pesado; tecidos branquiais.

INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente aquático por metais pesados é geralmente oriunda de resíduos das atividades agropastoris, das atividades industriais e urbanas (SIRAJ BASHA; USHA RANI, 2003).

O aumento da contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais, como o zinco, tem causado diversas alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas em organismos aquáticos (BORDAJANDI *et al.*, 2003; SIRAJ BASHA; USHA RANI, 2003; DAUTREMEPUITS *et al.*, 2004). Dessa forma, os danos às estruturas das células e tecidos, assim como características histopatológicas de órgãos alvos se constituem em importante parâmetro a ser considerado na avaliação do potencial tóxico de contaminantes sobre os organismos vivos (FENT, 1996), expressando, assim, as condições ambientais e representar o tempo de exposição aos quais estão submetidos os organismos (SCHMALZ *et al.*, 2002).

O zinco é classificado como micronutriente sendo, em alguns casos, requerido para a função celular (KARAN *et al.*, 1998; MCGEER *et al.*, 2000). Porém, em concentrações elevadas pode se tornar tóxico especialmente aos peixes e a outros organismos aquáticos (ROMANI *et al.*, 2003; CELIK; OEHLENSCHAGER, 2004). Isto ocorre porque os organismos podem bioacumular metais pesados, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos (VIARENGO, 1989).

As alterações morfológicas podem revelar os órgãos alvos mais afetados e detectar a sensibilidade do organismo em relação aos níveis tóxicos dos contaminantes aos quais foram expostos (WESTER; CANTON, 1991), podendo, inclusive, com as avaliações histopatológicas, diferenciar lesões promovidas por falhas internas de algum processo fisiológico daquelas induzidas por outros fatores ambientais como a exposição a poluentes (SCHWAIGER *et al.*, 1997).

As brânquias dos peixes exercem papéis vitais, visto que, além de ser o principal sítio de trocas gasosas (HUGHES, 1982) também estão envolvidas nos processos de osmorregulação (VERBOST *et al.*, 1994), equilíbrio ácido-

básico (GOSS *et al.*, 1992), excreção de compostos nitrogenados (SAYER; DAVENPORT, 1987) gustação (HUGHES, 1982) e participam do processo de alimentação, em alguns espécie por meio da filtração.

As brânquias da maioria dos teleósteos são compostas geralmente por quatro pares de arcos branquiais, que são sustentados por um esqueleto ósseo. Dos arcos branquiais partem filamentos sustentados por cartilagem (lamelas primárias), das quais partem as lamelas secundárias. As lamelas secundárias são constituídas por um epitélio simples, onde ocorrem as trocas gasosas (ROSSI, 2008).

O epitélio branquial é encontrado revestindo o arco branquial, os rastros, as lamelas primárias e as regiões interlamelares. Esse epitélio é estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de ricas em mitocôndrias (anteriormente descritas como células de cloreto (EVANS *et al.*, 2005)), além de botões gustativos e células pilares. O segundo tipo de epitélio é o chamado epitélio respiratório, o qual recobre as lamelas respiratórias. Geralmente, é constituído de uma única camada de células pavimentosas, através das quais ocorrem as trocas gasosas entre o sangue e o meio (EVANS *et al.*, 1982).

As células secretoras de muco são geralmente encontradas nos filamentos, mas o muco pode ser encontrado sobre o epitélio respiratório em peixes expostos a condições de estresse, sugerindo que a camada de muco proteja as superfícies lamelares contra agentes infecciosos, tóxicos e partículas em suspensão (POWELL *et al.*, 1992).

As brânquias apresentam-se lisas na região da lamela secundária e com microsaliências na região da lamela primária. As lamelas primárias são sustentadas por tecido cartilaginoso e possuem muitos vasos sanguíneos. As lamelas secundárias, por sua vez, são constituídas por três camadas de células: duas de células pavimentosas (externas) e uma camada intermediária constituída de células pilares (SILVA, 2004).

A multifuncionalidade das brânquias, a vasta área de superfície que ocupa e sua localização diretamente relacionada com meio externo, fazem das brânquias um órgão chave para compreender a relação do peixe com o ambiente e a ação dos poluentes existentes no meio aquático. Assim, as

alterações histológicas das brânquias são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados nos peixes pela exposição a diferentes poluentes (ARELLANO *et al.*, 1999).

Os efeitos dos poluentes sobre a estrutura branquial têm sido muito estudados em peixes coletados em ambientes poluídos ou expostos a testes laboratoriais, e as alterações histopatológicas encontradas têm sido utilizadas como um sensível indicador da contaminação aquática (PACHECO; SANTOS, 2002; MAZON *et al.*, 2002; FANTA *et al.*, 2003).

Em presença de poluentes, as brânquias podem exibir modificações que são consideradas respostas de defesa, e esta diminui a área da superfície em contato com o poluente. Entretanto, a dificuldade para a difusão do poluente para o meio interno ao mesmo tempo provoca uma redução na difusão dos gases respiratórios, podendo provocar hipóxia no peixe (FERNANDES; MAZON, 2003). Metais pesados, como o zinco, estimulam a proliferação de células ricas em mitocôndrias, aceleram a perda de íons e dificulta a absorção pelo epitélio em peixes de água doce (LAURENT; PERRY, 1991).

Em peixes coletados no Rio Piracicaba, na região do Vale do Aço – MG detectou-se altas concentrações de metais, destacando-se o zinco, devido à grande quantidade de efluente lançados pela atividade de mineração. Essa realidade aliada a escassez de dados na literatura sobre toxicologia de metais em espécies tropicais e dados histopatológicos da toxicologia do zinco em peixes, motivou a realização desse trabalho.

Neste contexto, propôs-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de zinco na histologia de brânquias de indivíduos adultos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*), após exposição aguda, e avaliar a espécie como bioindicador.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo com número 36/2008.

Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus*, colhidos aleatoriamente aos 70 dias pós-desova, na Piscicultura do Prata, Eugenópolis – MG, na bacia do rio Paraíba do Sul. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária, nos Laboratórios de Biologia Estrutural e de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Química, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados aquários de vidro, com capacidade de 150 L de água, livre de cloro (por decantação) e temperatura controlada (26 ± 1 °C) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W), mantendo-se 12 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 L/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20 % do volume de água dos aquários era sifonado, para eliminar restos de matéria orgânica, e imediatamente substituída, mantendo-se as mesmas características iniciais.

A qualidade da água foi monitorada a cada 24 horas, medindo-se o oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito através de kits colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH pelo medidor de pH digital portátil (Sammar 1700) e a condutividade elétrica pelo condutivímetro digital portátil (Tonka CD 840) (Anexo 2 – Tabela 2). Os valores de pH e dureza total estão de acordo com o banco de dados publicados pela FishBase para a espécie (FISHBASE, 2009). Oxigênio dissolvido e condutividade elétrica de acordo com Oyokawa *et al.*, 2006, e amônia tóxica, com Kubitza, 1999.

O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro controlado por temporizador.

Os peixes tiveram alimentação diária “*ad libitum*” ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida em três vezes ao dia: às 8, 13 e 17 horas.

No momento da aplicação dos tratamentos os peixes apresentavam-se com peso, comprimento padrão e altura médio de 3,914 g, 5,6 e 1,8 cm, respectivamente.

Os animais foram expostos a 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L de zinco na água, fornecido na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, e um grupo controle, durante 96 horas, em que cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 12 repetições. Ao final da exposição, os animais foram previamente anestesiados, com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia até serem eutanasiados.

Os dados biométricos foram mensurados com paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de $\pm 0,02$ mm, tanto daqueles peixes que morreram durante o período experimental quanto daqueles que foram eutanasiados. Foram retirados fragmentos de músculo, osso e brânquias, para a determinação da concentração de zinco nestes tecidos através de espectrofotometria de absorção atômica.

Fragmentos de brânquias foram fixados em solução de Karnovsky (glutaraldeído 4 % e paraformaldeído 4 %) por 24 horas e depois transferidos para álcool 70 %. Em seguida, foram desidratados em série etanólica crescente, com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin[®], Leica).

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

Para as análises histológicas foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias utilizando 10 campos/animal: hiperplasia, fusão lamelar, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, ruptura de membrana, deleção do epitélio lamelar secundário e produção excessiva de muco.

Os resultados de acúmulo de zinco nos órgãos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os demais resultados foram analisados de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Zn nos aquários foi monitorado diariamente, verificando-se que as concentrações deste elemento sofreram pequeno decréscimo com o desenvolvimento do experimento, permanecendo aproximadamente estáveis até o final, ou até que os animais atingissem 100 % de mortalidade (Anexo 1-Tabela 1).

Nos tratamentos controle e em que as concentrações de zinco foram de 3 e 5 mg/L, não houve mortalidade dos peixes até o final do experimento. Com 24 horas de exposição, o tratamento que recebeu 20 mg/L apresentou 100 % de mortalidade. No tratamento que recebeu 15 mg/L, após 24 h da aplicação do tratamento, 67 % dos peixes morreram, e com 72 horas de exposição, a mortalidade foi de 75 % (Anexo 3 – Tabela 2), indicando o alto nível de toxicidade do zinco para a espécie em estudo. No tratamento cuja concentração de zinco foi de 10 mg/L, a mortalidade dos peixes atingiu 50 % após 24 horas de exposição, não ocorrendo mais nenhuma morte até o final das 96 horas. Assim, pode-se estimar a Concentração Letal de 50 % dos organismos (CL50-96 horas) na exposição aguda para *A. aff. bimaculatus* como sendo de 10 mg/L de zinco (Anexo 3 - Tabela 2), o dobro do permitido pela legislação brasileira (5 mg/L) na água para criação de animais (CONAMA, 2005).

Nos tratamentos que receberam 10, 15 e 20 mg/L, tanto os peixes que morreram quanto aqueles que permaneceram vivos até o final das 96 horas de exposição apresentaram comportamento anormal, permanecendo próximos a superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia, ao passo que os animais que não receberam o zinco ou aqueles que receberam o metal nas concentrações de 3 ou 5 mg/L, movimentavam intensamente em cardumes e se alimentavam normalmente, mostrando comportamento característico da espécie.

Nos tratamentos em que a concentração de zinco na água foi superior a 10 mg/L, o acúmulo desse metal foi maior em brânquias, seguido do osso. A musculatura não apresentou diferenças de concentração entre os tratamentos, talvez por não ter havido tempo suficiente para causar tal acúmulo (Figura 1).

Em brânquias, os tratamentos cujas dosagens de zinco foram iguais ou inferiores a 5 mg/L, não apresentaram diferença de concentração significativa entre eles (Figura 1). Nos tratamentos subseqüentes, à medida que se aumentou a concentração na água, aumentaram-se também o acúmulo nas brânquias, caracterizando dose dependência (Figura 1). McGeer *et al.*, (2000) verificaram o acúmulo de cádmio, cobre e zinco em diferentes tecidos de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) em um experimento de exposição crônica, e observaram acúmulo significativo dos metais nas brânquias, fígado e rim dos peixes expostos quando comparados aos controles.

Nos ossos, os tratamentos cujas dosagens de zinco foram iguais ou inferiores a 5 mg/L, não diferiram estatisticamente entre si quanto ao acúmulo desse metal (Figura 1), provavelmente devido a essencialidade desse oligoelemento à nutrição dos animais. Desta forma, nas menores concentrações, foi metabolizado ou excretado, não caracterizando toxicidade aos peixes. Porém, à medida que se aumentou a concentração de zinco na água dos aquários, houve maior acúmulo no osso (Figura 1). Hogstrand & Wood (1995) demonstraram que um dos mais importantes efeitos subletais do Zn^{2+} em peixes é a inibição da absorção de cálcio (Ca^{2+}), já que estes íons competem pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias. Conseqüentemente, o excesso de zinco pode levar a hipocalcemia. A redução da concentração de Ca^{2+} é prejudicial ao organismo, já que este elemento é essencial para a integridade da membrana celular e estabilização da permeabilidade branquial (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

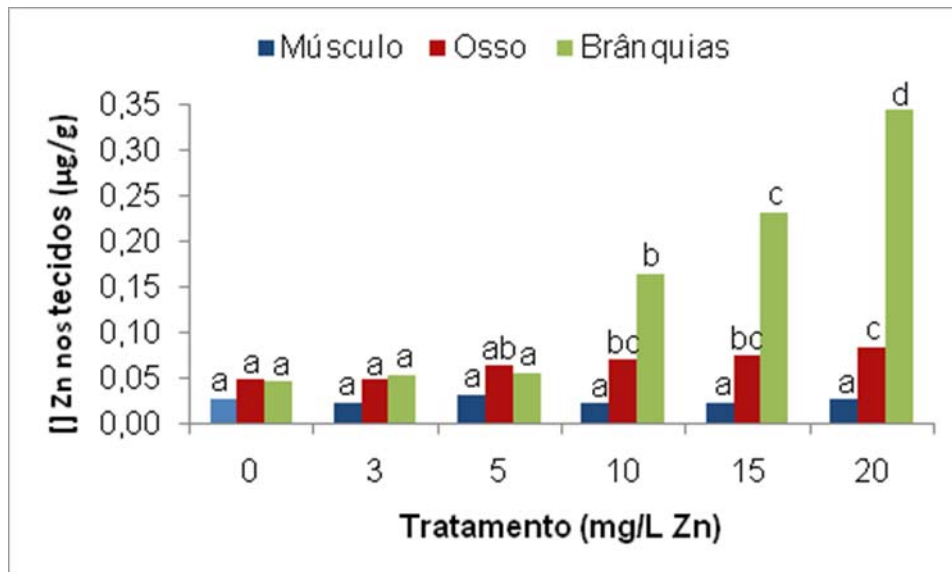


Figura 1. Concentração de zinco nos tecidos (músculo, osso e brânquias) de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a diferentes concentrações de zinco na água.

*Letras iguais sobre barras de mesma cor não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

As brânquias do grupo controle apresentaram-se com distribuição normal dos constituintes celulares e padrão de organização das lamelas primárias, secundárias e vasos sanguíneos (Figura 2).

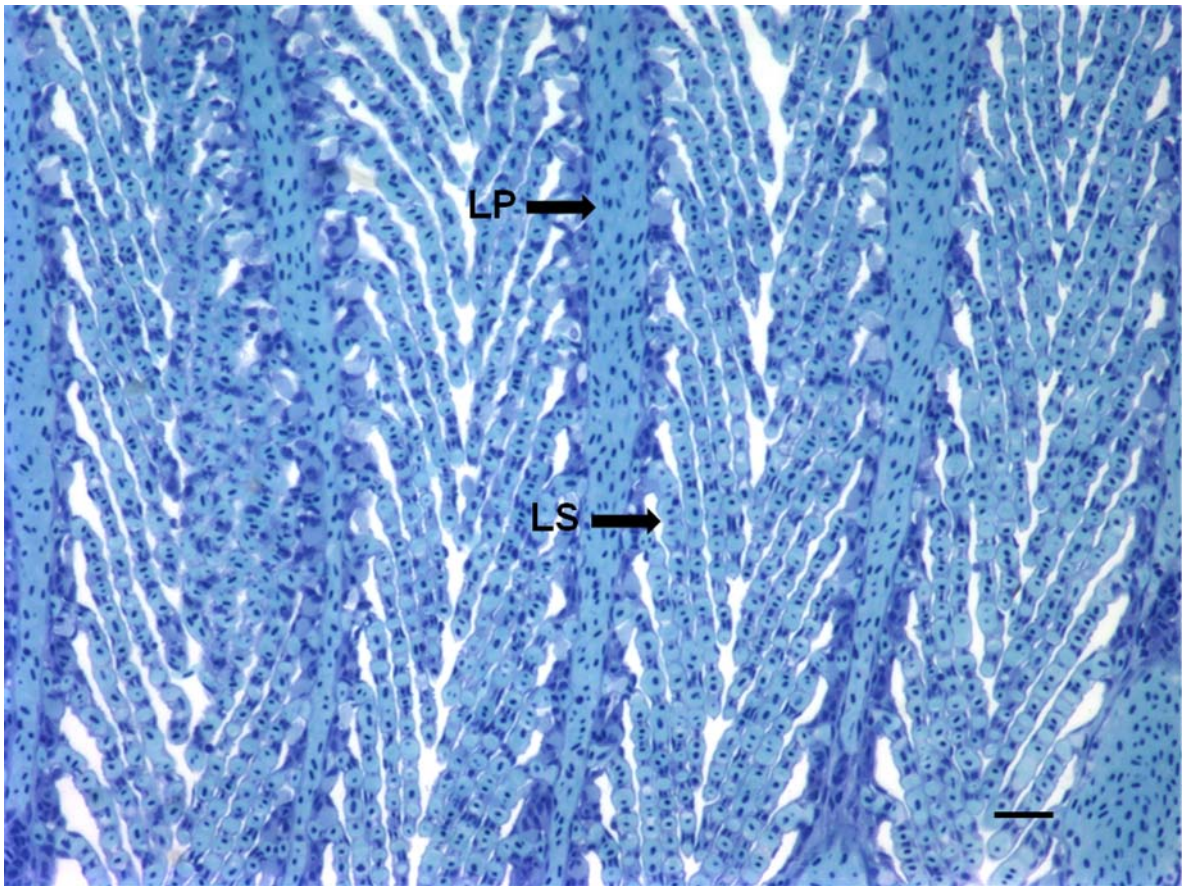


Figura 2. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* do grupo controle.

(LP) lamela primária, (LS) lamela secundária. Note o padrão de organização das células nas lamelas secundárias. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

As alterações histopatológicas encontradas foram hiperplasia, fusão lamelar, aneurisma, destruição do epitélio lamelar, ruptura de membrana, deleção do epitélio lamelar secundário, produção excessiva de muco.

Verificou-se aparecimento de edema nos epitélios lamelar e filamentar nos tratamentos que receberam concentrações de zinco superiores a 3 mg/L, com maior incidência na superfície das lamelas secundárias, levando a intenso destacamento epitelial, destruição e deleção de lamelas secundárias (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8). Essas alterações estruturais são consideradas as principais causas de exposição a metais pesados (MALLATT, 1985; OSTRENSKI *et al.*, 2001; NERO *et al.*, 2006; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

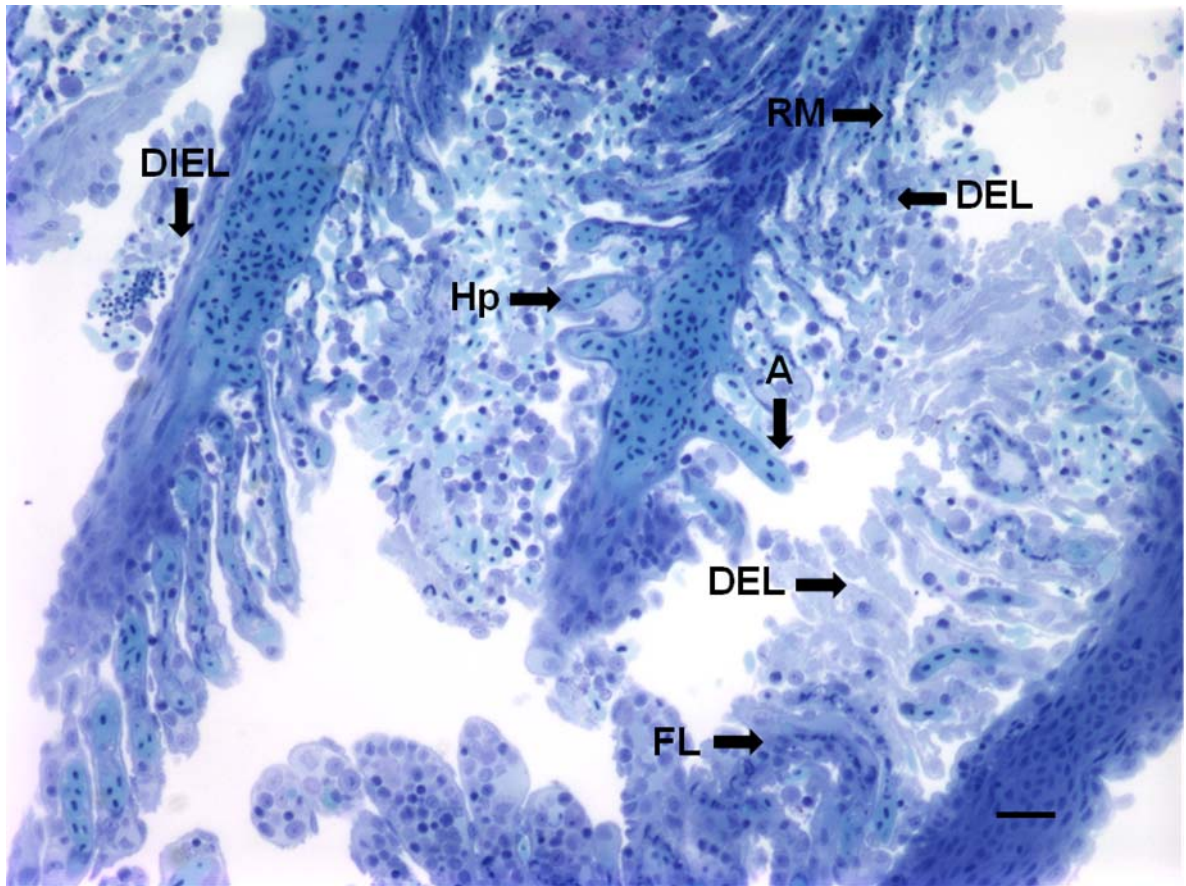


Figura 3. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 5 mg/L de zinco na água.

Hp = hiperplasia; FL = fusão lamelar; A = aneurisma; DEL = destruição do epitélio lamelar; RM = ruptura de membrana; DIEL = deleção do epitélio lamelar secundário; Barra = 30 µm. Coloração Azul de toluidina.

No tratamento que recebeu 3 mg/L de zinco, houve 83,3 % de destruição do epitélio lamelar, sendo que nos tratamentos subseqüentes essa destruição foi de 100 %. A deleção do epitélio lamelar, conseqüência da destruição das lamelas secundárias, aumentou gradativamente de acordo com o aumento das concentrações de zinco nos tratamentos. No tratamento que recebeu 5 mg/L de zinco, a deleção das lamelas secundárias foi de 50 %, indicando toxicidade para os peixes da espécie em estudo. Nos tratamentos de 10 e 15 mg/L de zinco a porcentagem de deleção lamelar secundária foi de 83,3, comprometendo as funções fisiológicas das brânquias, explicando o alto índice de mortalidade apresentado durante a exposição ao metal. O tratamento de 20 mg/L de zinco causou deleção lamelar secundária de 91,7% das brânquias dos

peixes, levando a mortalidade de todos os peixes do tratamento em um curto período de exposição (24 horas) (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7,8).

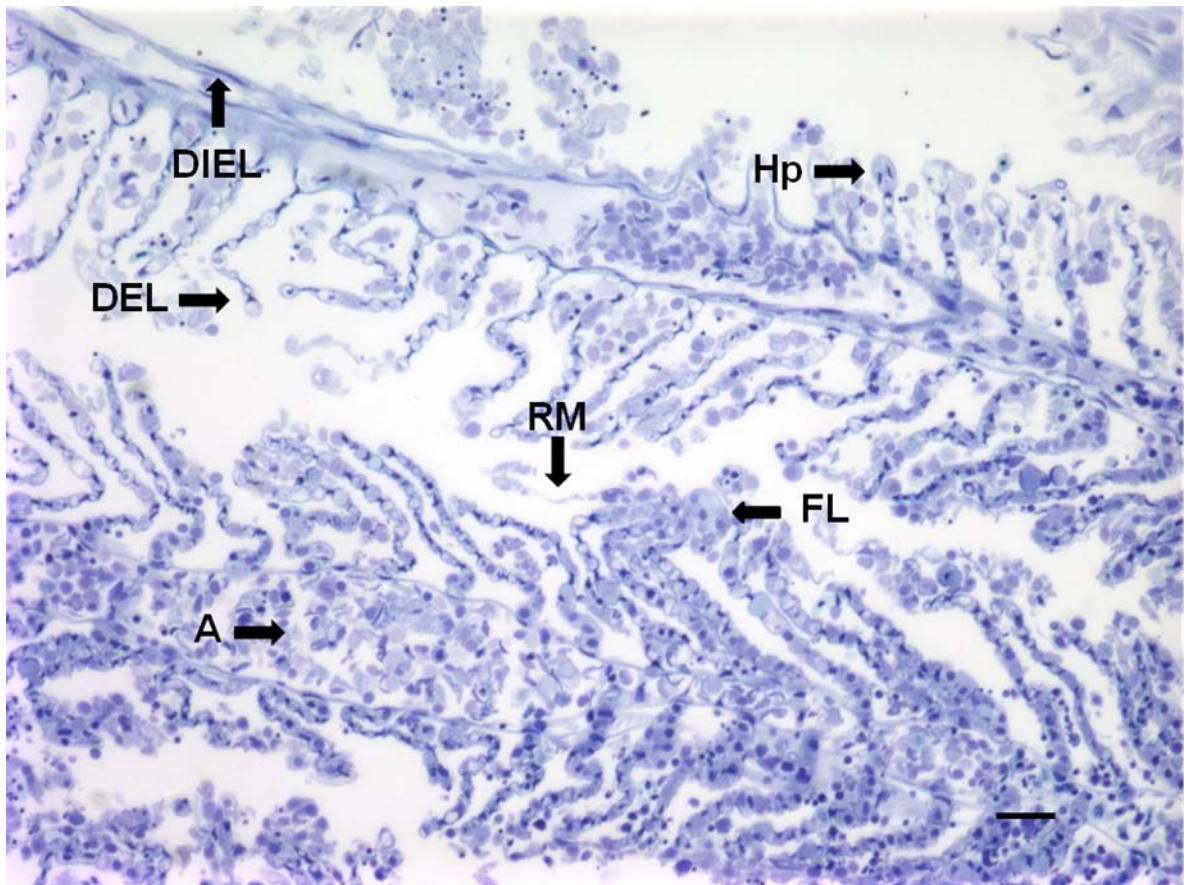


Figura 4. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 10 mg/L de zinco na água. Hp = hiperplasia; FL = fusão lamelar; A = aneurisma; DEL = destruição do epitélio lamelar secundário; RM = ruptura de membrana; DIEL = deleção do epitélio lamelar secundário. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

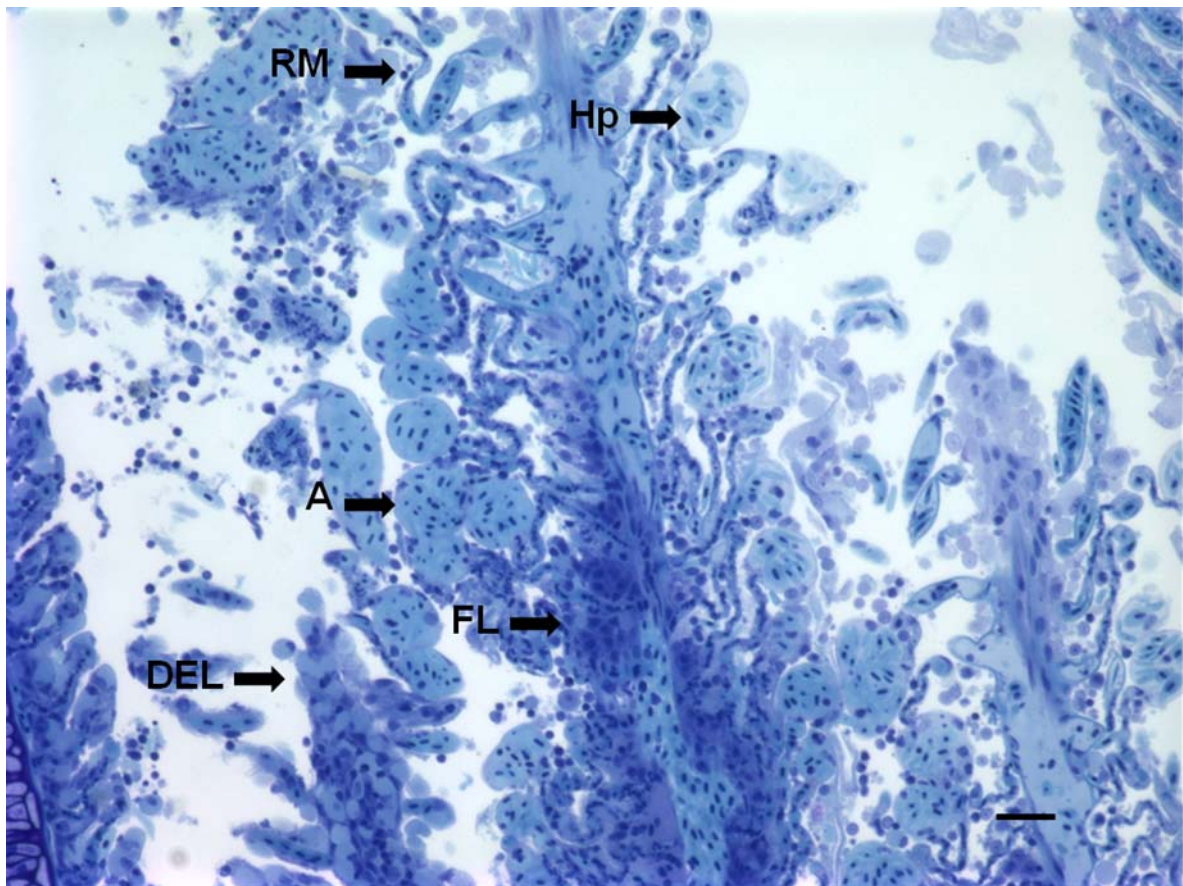


Figura 5. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 15 mg/L de zinco na água. Hp = hiperplasia; FL = fusão lamelar; A = aneurisma; DEL = destruição do epitélio lamelar secundário; RM = ruptura de membrana. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

A proliferação do epitélio lamelar, levou à fusão parcial e total das lamelas secundárias, nos tratamentos que receberam concentração acima de 3 mg/L de zinco. No tratamento controle, a porcentagem que apresentou-se como fusão lamelar (25 %) pode ser justificado pelo processo de inclusão, devido à grande mobilidade das lamelas secundárias que se sobrepõe com facilidade. Como os componentes celulares das lamelas dos animais do grupo controle estavam normais foi descartada a possibilidade das poucas fusões encontradas serem consideradas alterações patológicas. A partir do tratamento utilizando-se concentração de 5 mg/L de zinco, a fusão de lamelas foi de 100 %, indicando que os peixes sofreram interferência no sistema respiratório causadas pela exposição ao metal (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7,8).

A presença de edema acompanhada pelo destacamento do epitélio lamelar é o primeiro sinal da patologia em peixes (THOPHON *et al.*, 2003). Edemas do epitélio filamentar e lamelar também têm sido descritos em peixes expostos a diferentes poluentes (ARELLANO *et al.*, 2000). Estes espessamentos podem ser devido à proliferação de células de ricas em mitocôndrias e de células indiferenciadas (DANG *et al.*, 1999), o que causa fusão parcial ou total das lamelas secundárias. Esse efeito pode ser um mecanismo de proteção, pois diminui a área de exposição das lamelas secundárias ao agente tóxico (CENGIZ; UNLU, 2002; CRUZ, 2005). Resultados semelhantes foram observados em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) exposta ao cobre por Monteiro (2001) e Monteiro *et al.*, (2005).

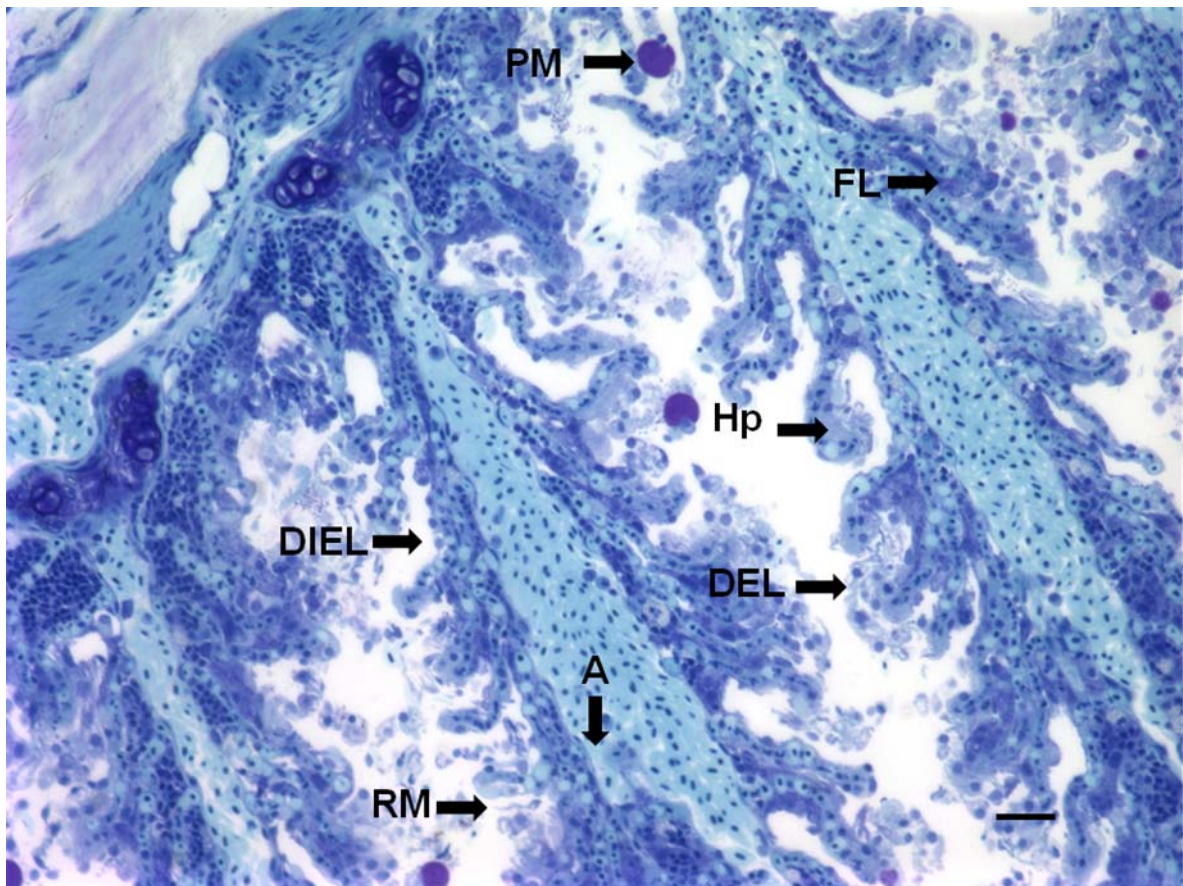


Figura 6. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais e *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 15 mg/L de zinco na água. Hp = hiperplasia; FL = fusão lamelar; A = aneurisma; DEL = destruição do epitélio lamelar; RM = ruptura de membrana; DIEL = deleção do epitélio lamelar secundário; PM = produção excessiva de muco. Barra = 30 µm. Coloração Azul de toluidina.

A dilatação do eixo vascular das lamelas também foi observada, conduzindo à ruptura das células pilares, com perda da capacidade de suporte (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7,8). Este fato pode ter conduzido ao aparecimento de aneurismas lamelares. Resultados similares foram observados em robalo asiático (*Lates calcarifer*) submetidos à exposição ao cádmio (THOPHON *et al.*, 2003).

Nos animais do grupo controle e no tratamento de 3 mg/L de zinco, não houve produção excessiva de muco. Apesar de não ter sido quantificado o aumento de células mucosas, foi observado aumento na produção de muco iniciando no tratamento que recebeu 5 mg/L de zinco (8,3%), sendo crescente

e correlacionando-se positivamente com o aumento da concentração de zinco em que os peixes foram expostos, chegando a atingir 91,7% quando a concentração de Zn foi máxima (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7,8). O aumento das células mucosas provoca hipersecreção de muco que pode levar a proteção da estrutura tecidual em situações ambientais adversas e exposição a possíveis agentes tóxicos (MALLATT, 1985). Assim, pode-se inferir que o aumento da produção de muco foi um mecanismo de defesa, porém nas concentrações mais elevadas (acima de 10 mg/L) não foi suficiente para a completa proteção contra o agente tóxico levando a maioria dos animais à morte. O excesso de muco também pode prejudicar as trocas gasosas, contribuindo para a mortalidade dos peixes.

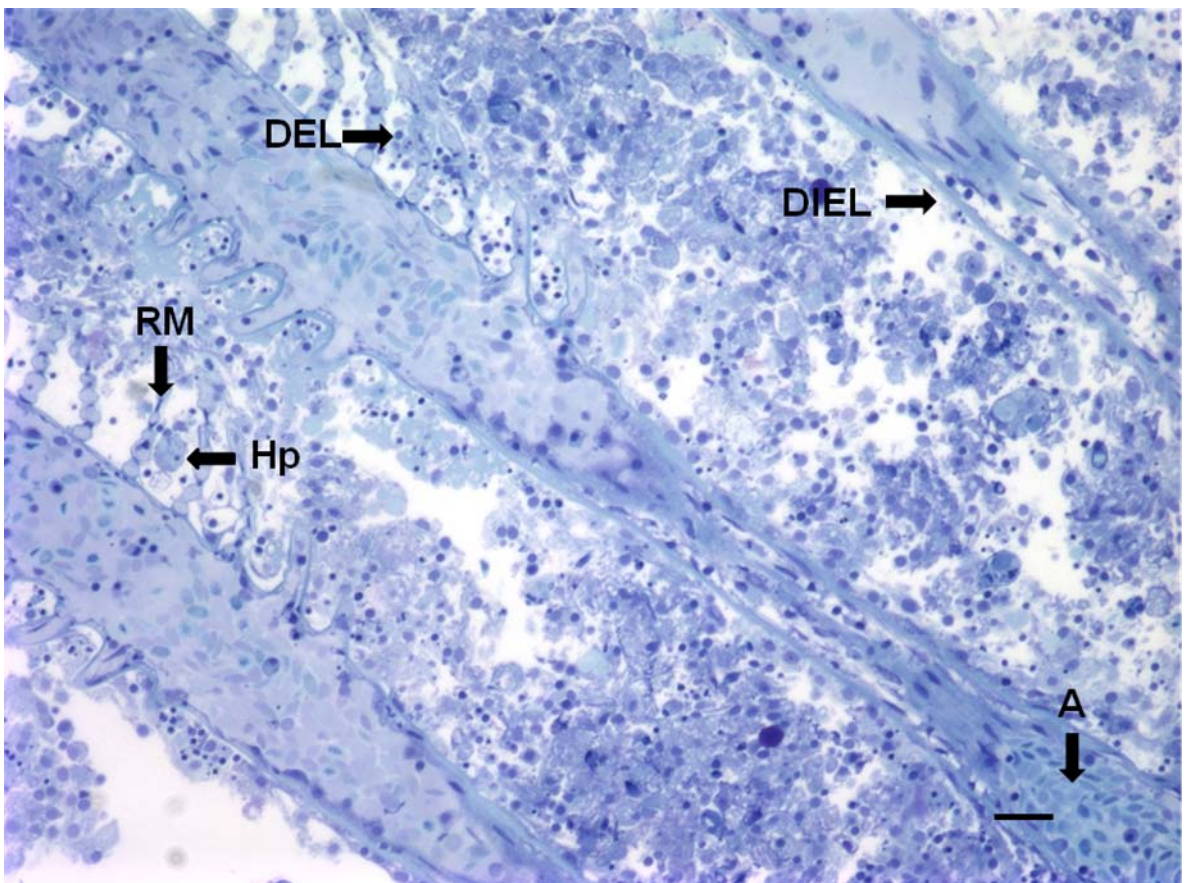


Figura 7. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 20 mg/L de zinco na água. Hp = hiperplasia; A = aneurisma; DEL = destruição do epitélio lamelar; RM = ruptura de membrana; DIEL = deleção do epitélio lamelar secundário. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

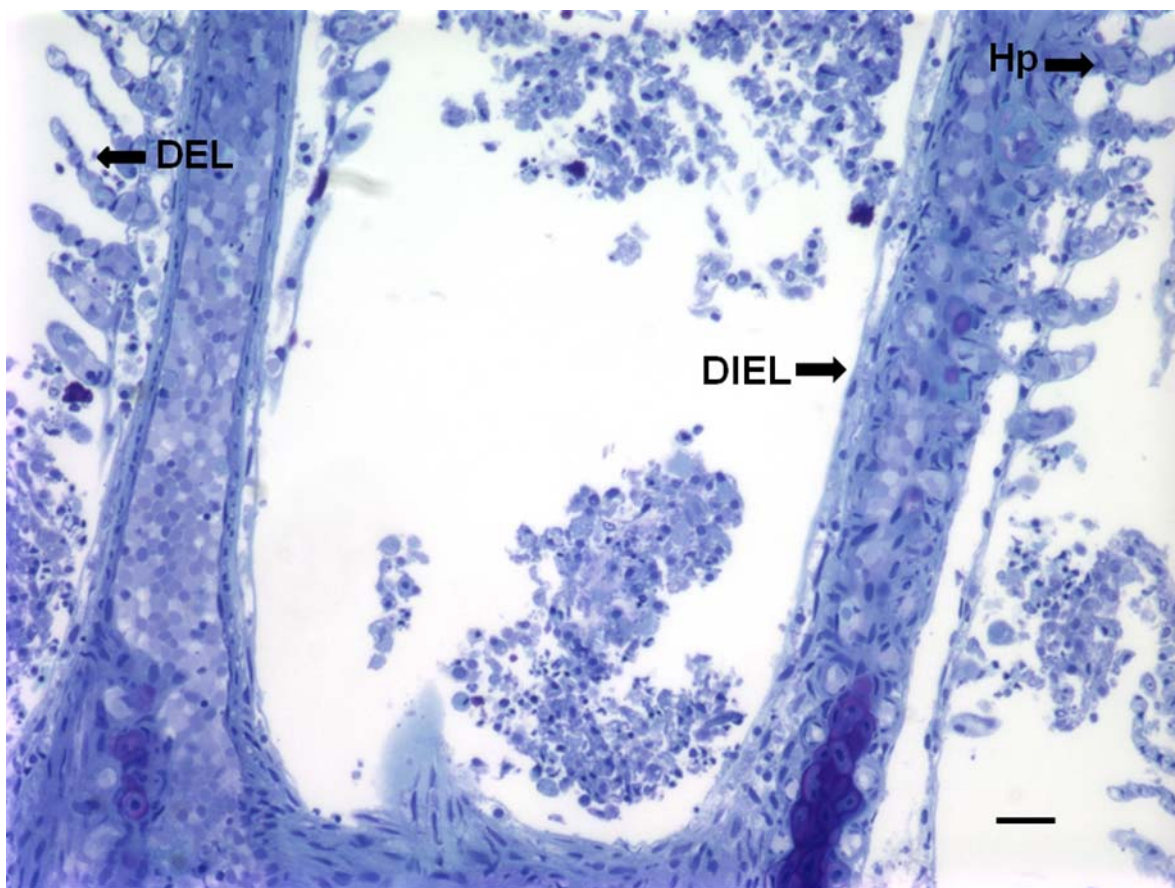


Figura 8. Fotomicrografia da organização estrutural dos filamentos branquiais de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 20 mg/L de zinco na água. Hp = hiperplasia; DEL = destruição do epitélio lamelar; DIEL = deleção do epitélio lamelar secundário. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

A Resolução CONAMA n° 357 de 17/03/2005, estabelece o valor máximo de 5 mg/L de Zn^{2+} para água própria para a criação de animais (CONAMA, 2005). No entanto, essa concentração de zinco na água evidentemente comprometeu as funções branquiais da espécie estudada, conforme foi demonstrado neste trabalho, indicando assim, a necessidade de revisão desta legislação brasileira.

Tabela 1: Percentual de alterações histopatológicas detectadas em machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de zinco.

Concentração de Zinco (mg/L)	Histopatologias branquiais (%)						
	Hp	FL	A	DEL	RM	DIEL	PM
0	25,0	25,0	16,6	0,0	25,0	0,0	0,0
3	83,3	91,6	75,0	83,3	83,3	50,0	0,0
5	91,6	100,0	100,0	100,0	100,0	50,0	8,3
10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	16,6
15	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	75,0
20	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	91,6	91,6

Legenda: Hp = hiperplasia; FL = fusão lamelar; A = aneurisma; DEL = destruição do epitélio lamelar; RM = ruptura de membrana; DIEL = Deleção do epitélio lamelar secundário; PM = produção excessiva de muco.

As brânquias demonstraram ser um excelente indicador de contaminação ambiental para Zn, por estarem em contato direto com a água e por sua constituição histológica, além da grande área de superfície e alta permeabilidade, relacionada com as trocas gasosas.

CONCLUSÕES

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

A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao zinco provocou alterações histopatológicas branquiais, sendo que essas patologias correlacionaram-se positivamente com o aumento da concentração de zinco, comprometendo sua função respiratória e causando a morte dos peixes.

Houve maior acúmulo de zinco nos tecidos branquiais seguido de osso. A musculatura não apresentou acúmulo significativo.

Pôde-se estimar a CL50-96 horas na exposição aguda para *A. aff. bimaculatus* como sendo de 10 mg/L de zinco na água.

O *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando submetidos a baixas concentrações de zinco na água, e, portanto, é adequado como bioindicador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARELLANO, J.M.; BLASCO, J.; ORTIZ, J.B.; CAPETA-DA SILVA, D.; NAVARRO, A.; SANCHEZ-DEL PINO, M.J.; SARASQUETE, C. Accumulation and histopathological effects of copper in gills and liver of Senegales sole, *Solea senegalensis* and toad fish, *Halobatrachus didactylus*. **Ecotoxicology and Environmental Restoration**. v.3, n.1, p.22-28, 2000.

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

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

CELIK, U.; OEHLENSCHLAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, v.87, p.343-347, 2004.

CENGIZ, E.I.; UNLU, E. Histopathological changes in the gills of mosquito fish *Gambusia affinis* exposed to endosulfan. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.68, p.290-296, 2002.

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

CRUZ, C. **Aspectos toxicológicos de paration metílico e de extrato aquoso de folhas secas de nim (*Azadirachta indica*) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e eficácia no controle de monogenea Dactylogyridae.** 2005. 81p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2005.

DANG, Z.; LOCK, R.A.C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.277, p.320–331, 1999.

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

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

EVANS, D.H.; PIERMARINI, P.M.; CHOE, K.P. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. **Physiological Reviews**. v.85, p.97-177, 2005.

EVANS, D.H.; CLAIBORNE, J.B.; FARMER, L.; MALLERY, C.; KRASNY, E.J. Fish gill ionic transport : methods and models. **The Biological Bulletin**, v.163, p.108-130, 1982.

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

FENT, K. Ecotoxicology of organotin compounds. **Critical Reviews in Toxicology**, v.26, n.1, p.3-10, 1996.

FERNANDES, M.N.; MAZON, A.F. Environmental pollution and gill morphology. In: VAL, A.L.; KAPOOR, B.G. (Eds.). **Fish adaptations**. USA: Science Publishers. 2003, c.9, p.203– 231.

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

GOSS, G.G.; PERRY, S.F.; WOOD, C.M.; LAURENT, P. Mechanisms of ion and acid-base regulation at the gills of freshwater fish. **Journal of Experimental Zoology**, v.263, p.143-159, 1992.

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

HUGHES, G.M. An introduction to the study of gills. In: HOULIHAN, D.F.; RANKIN, J.C.; SHUTTLEWORTH, T.J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p1-24.

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

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3. ed. Jundiaí: F. Kubitza. 97p., 1999.

LAURENT, P.; PERRY, S. F. Environmental effects on fish gill morphology. **Physiological Zoology**, v.64, n.1, p.4-25, 1991.

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

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

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

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

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

NERO, V., FARWELL, A., LISTER, A., VAN DER KRAAK, G., LEE, L.E.J., VAN MEER, T., MACKINNON, M.D., DIXON, D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 63, p.365-377,2006.

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

OSTRENSKI, A., CHAVES, P.T.C., DUBOC, L.F., GUIMARÃES, A.T.B., CRUZ, S.R.Z., WEGBECHER, F.X., PILCHOWSKI, R.W., TEIXEIRA, U.A., BELZ, C.E., 2001. Monitoramento ictiofaunístico pós-derramamento de óleo nos Rios Barigüí e Iguaçu. In: UN-REPAR/PETROBRÁS. **2º Seminário do Rio Iguaçu** . p. 32–52, 2001.

OYAKAWA, T.O.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. **Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguaçu no Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Neotrópica, 2006, 201p.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p.331 – 347, 2002.

POWELL, M. D.; SPEARE, D. J.; BURKA, J. F. Fixation of mucus on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) gills for light and electron microscopy. **Journal of Fish Biology**, v.41, p.813-824, 1992.

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

ROSSI, S. **Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei)**. 2008, 65p. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

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

SCHMALZ, W.F., HERNANDEZ, A.D., WEIS, P. Hepatic histopathology in two populations of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. **Marine Environmental Research**, v.54, p.539–542, 2002.

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

SILVA, M. D. **Biomonitoramento de uma reserva particular do patrimônio natural – RPPN – através do estudo de biomarcadores em *Astyanax sp.*** 2004, 55p. Trabalho de conclusão de Curso (Ciências Biológicas), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

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

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

VERBOST, P.M.; SCHOENMAKERS, T.J.M.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S.E. Kinetics of ATP and Na⁺ gradient driven Ca⁺² transport in basolateral membranes from gills of freshwater and seawater adapted tilapia. **Journal of Experimental Biology**, v.186, p.95-108, 1994.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences**. v.1, p.295. 1989.

WESTER, P.W.; CANTON, J.H. The usefulness of histopathology in aquatic toxicity studies. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.100, p.115-117, 1991.

CAPÍTULO 2

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM FÍGADO DE *Astyanax aff. bimaculatus* CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO ZINCO

RESUMO

A interferência do homem na natureza, a poluição e a contaminação do ambiente devido à crescente carga de efluentes lançados, vem agravando os problemas de contaminação ambiental. Quando se considera a ação de poluentes químicos sobre os peixes o fígado é considerado um órgão chave. É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e, provavelmente, também para excreção de metais. Neste contexto, com este trabalho propôs-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de zinco na histologia de fígado de indivíduos adultos de lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*), após exposição aguda. Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus* adultos divididos em seis grupos de tratamentos, com 12 repetições. Os tratamentos foram cinco concentrações de zinco: 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L mais um grupo controle. A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, laboratório de Morfofisiologia de Peixes. Após o tempo de exposição de 96 horas, os animais foram eutanasiados, pesados, medidos e retirado fragmentos de fígado, músculos e ossos. Fragmentos de fígado foram fixados e incluídos, seccionados em micrótomo rotativo e coradas para confecção de lâminas. Fragmentos de osso, músculo e fígado foram desidratados e digeridos para quantificação da absorção do zinco. Durante o período experimental a água dos aquários apresentou-se com características físico-químicas dentro dos limites considerados aceitáveis para oxigênio dissolvido, pH, amônia tóxica, condutividade elétrica, dureza total e temperatura. Pôde-se estimar a CL50/96 horas na exposição aguda como sendo de 10 mg/L de zinco. O zinco mostrou-se altamente tóxico, em exposição aguda mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira. As alterações histopatológicas encontrados foram congestão vascular, diminuição do volume celular, deslocamento de núcleo do hepatócito, necrose, desarranjo da estrutura cordonal, infiltrado leucocitário, vacuolização, sendo

mais graves nos tratamentos expostos às maiores concentrações de zinco. O aumento da concentração de zinco na água comprometeu as funções fisiológicas do fígado. O aumento no número de hepatócitos é um indicativo de mecanismo compensatório para restabelecimento da homeostase em função dos efeitos tóxicos do zinco.

PALAVRAS-CHAVE: Efeitos toxicológicos; lambaris; hepatócitos; metal pesado.

INTRODUÇÃO

A interferência do homem na natureza, a poluição e a contaminação do ambiente devido à crescente carga de efluentes lançados no ar, na água e nos solos, vem agravando os problemas de contaminação ambiental. O ecossistema aquático é considerado o mais suscetível à poluição e contaminação (BERTOLETTI, 1990).

A poluição aquática está comumente associada com a descarga de efluentes domésticos, industriais ou agrícolas (MANSON, 1996) e pode ocorrer de forma intencional ou acidental, a partir de fontes naturais ou em decorrência da atividade humana (JOBLING, 1995).

Existe grande quantidade de poluentes que afetam o ambiente aquático e cujos efeitos são preocupantes. Assim, a compreensão detalhada dos efeitos destes diferentes tipos de efluentes nos corpos d'água receptores é essencial para o controle da poluição (MARTINEZ; CÓLUS, 2002). Os metais pesados estão entre as principais classes de contaminantes que são freqüentemente encontrados nestes ecossistemas (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005; NIGRO *et al.*, 2006; MUNTEANU; MUNTEANU, 2007).

Quando peixes e outros organismos aquáticos são expostos a ambientes muito degradados, os efeitos dos poluentes podem ser dramáticos. No caso de poluição severa pode haver mortalidade quase instantânea e longos períodos de exposição a ambientes menos degradados podem resultar na morte de alguns indivíduos dentro de uma população, ou ainda em danos bastante visíveis. Entretanto, a curta exposição a estressores ambientais pode resultar em alterações que, mesmo não sendo letais, prejudicam a habilidade do peixe em realizar suas funções fisiológicas (RAND; PETROCELLI, 1985; JOBLING, 1995).

O zinco é classificado como micronutriente sendo, em alguns casos, requerido para a função celular (KARAN *et al.*, 1998; MCGEER *et al.*, 2000). Porém, em concentrações elevadas pode se tornar tóxico especialmente aos peixes e a outros organismos aquáticos (ROMANI *et al.*, 2003; CELIK & OEHLENSCHAGER, 2004). Isto ocorre porque os organismos podem bioacumular metais pesados, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo

grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos (VIARENGO, 1989).

Alterações histopatológicas resultam de uma variedade de mudanças bioquímicas e fisiológicas no organismo, que podem levar a formação de lesões nas células, nos tecidos ou órgãos (HINTON *et al.*, 1992). Lesões histopatológicas têm sido freqüentemente descritas como importantes ferramentas em estudos de biomonitoramento devido à facilidade de interpretação, tanto em situações de exposição aguda quanto crônica (WESTER *et al.*, 2002; GÜL *et al.*, 2004; OLIVEIRA RIBEIRO *et al.*, 2005).

Quando se considera a ação de poluentes químicos sobre os peixes, o fígado é considerado um órgão chave. É o primeiro órgão na biotransformação dos xenobióticos e, provavelmente, também para excreção de metais. Assim, muitos metais e outros xenobióticos se acumulam no fígado, de modo que suas células ficam expostas a um nível elevado de agentes químicos que podem estar presentes no ambiente ou mesmo em outros órgãos do peixe (HEATH, 1987; GÜL *et al.*, 2004).

As células hepáticas têm várias funções vitais além da secreção da bile e metabolismo de xenobióticos. Elas apresentam importante papel no metabolismo das proteínas, lipídios e carboidratos e, além disso, estão envolvidas na hematopoese e na produção de anticorpos durante o período larval dos peixes. Adicionalmente, elas também servem como local de estocagem para alguns nutrientes (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; PARIS-PALÁCIOS *et al.*, 2000).

Deste modo, os efeitos hepatotóxicos dos diversos agentes químicos podem ser utilizados como biomarcadores de contaminação aquática (HINTON *et al.*, 1992). Na presença de poluentes, o fígado pode desenvolver alterações histológicas nos hepatócitos, que podem ser usadas para o monitoramento de efeitos de contaminantes (THOPHON *et al.*, 2003; FANTA *et al.*, 2003).

Áreas de necrose, danos nucleares e morte celular foram relatados por Rabbito *et al.* (2005) em traíras (*Hoplias malabaricus*) após exposição crônica a chumbo inorgânico. Oliveira Ribeiro *et al.* (2002) observaram desorganização citoplasmática e áreas de necrose após exposição trófica ao metil-mercúrio.

Assim, alguns parâmetros hepáticos tais como alterações histopatológicas e depleção de glicogênio, têm sido utilizados em programas de biomonitoramento (FANTA *et al.*, 2003).

Em peixes coletados no Rio Piracicaba, na região do Vale do Aço – MG detectou-se altas concentrações de metais, destacando-se o zinco, devido à grande quantidade de efluente lançados pela atividade de mineração. Essa realidade aliada à escassez de dados na literatura sobre toxicologia de metais em espécies tropicais e de dados histopatológicos da toxicologia do zinco em peixes, motivou a realização desse trabalho.

Neste contexto, propôs-se os efeitos de diferentes concentrações de zinco na histologia hepática de lambaris adultos, após exposição aguda e avaliar a espécie como bioindicador.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo com número 36/2008.

Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus*, colhidos aleatoriamente aos 70 dias pós-desova, na Piscicultura do Prata, Eugénópolis – MG, na bacia do rio Paraíba do Sul. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária, nos Laboratórios de Biologia Estrutural e de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Química, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados aquários de vidro, com capacidade de 150 L de água, livre de cloro (por decantação) e temperatura controlada (26 ± 1 °C) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W), mantendo-se 12 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 L/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos

aquários era sifonado, para eliminar restos de matéria orgânica, e imediatamente substituída, mantendo-se as mesmas características iniciais.

A qualidade da água foi monitorada a cada 24 horas, medindo-se o oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito através de kits colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH pelo medidor de pH digital portátil (Sammar 1700) e a condutividade elétrica pelo condutivímetro digital portátil (Tonka CD 840) (Anexo 2 – Tabela 2). Os valores de pH e dureza total estão de acordo com o banco de dados publicados pela FishBase para a espécie (FISHBASE, 2009). Oxigênio dissolvido e condutividade elétrica de acordo com Oyokawa *et al.*, 2006, e amônia tóxica, com Kubitza, 1999.

O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro controlado por temporizador.

Os peixes tiveram alimentação diária “*ad libitum*” ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida em três vezes ao dia: às 8, 13 e 17 horas.

No momento da aplicação dos tratamentos os peixes apresentavam-se com peso, comprimento padrão e altura médio de 3,914 g, 5,6 e 1,8 cm, respectivamente.

Os animais foram expostos a 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L de zinco na água, fornecido na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, e um grupo controle, durante 96 horas, em que cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 12 repetições. Ao final da exposição, os animais foram previamente anestesiados, com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia até serem eutanasiados.

Os dados biométricos foram mensurados com paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de $\pm 0,02$ mm, tanto daqueles peixes que morreram durante o período experimental quanto daqueles que foram eutanasiados. Foram retirados fragmentos de músculo, osso e brânquias, para a determinação da concentração de zinco nestes tecidos através de espectrofotometria de absorção atômica.

Fragmentos de fígado foram fixados em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 4% e Paraformaldeído 4%) por 24 horas e depois transferidos para álcool 70%. Em seguida, foram desidratados em série etanólica crescente,

com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin[®], Leica).

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

Para as análises histológicas do fígado foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias: diminuição do volume celular; deslocamento de núcleo do hepatócito; necrose; desarranjo da estrutura cordonal; infiltrado leucocitário e vacuolização.

Histometricamente foram quantificados pontos sobre núcleo e citoplasma de hepatócitos, capilar sinusóides e infiltrados leucocitários totalizando 798 pontos/animal calculando o percentual de constituição tecidual hepática. Para determinação do diâmetro nuclear dos hepatócitos, foram medidos 30 núcleos com auxílio do programa para análise de imagem Image Pro Plus.

Os resultados de acúmulo de zinco nos órgãos e das variações nas áreas nucleares de hepatócitos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os demais resultados foram analisados de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Zn nos aquários foi monitorado diariamente, verificando-se que as concentrações deste elemento sofreram pequeno decréscimo com o desenvolvimento do experimento, permanecendo aproximadamente estáveis até o final, ou até que os animais atingissem 100 % de mortalidade (Anexo 1- Tabela 1).

Nos tratamentos controle e naqueles em que as concentrações de zinco foram de 3 e 5 mg/L, não houve mortalidade dos peixes até o final do experimento. Com 24 horas de exposição, o tratamento que recebeu 20 mg/L

apresentou 100 % de mortalidade. No tratamento que recebeu 15 mg/L, após 24 h da aplicação do tratamento, 67% dos peixes morreram, e com 72 horas de exposição, 75 % (Anexo 3 – Tabela 2), indicando o alto nível de toxicidade do zinco para a espécie em estudo. No tratamento cuja concentração de zinco foi de 10 mg/L, a mortalidade dos peixes atingiu 50 % após 24 horas de exposição, não ocorrendo mais nenhuma morte até o final das 96 horas. Assim, pode-se estimar a Concentração Letal de 50 % dos organismos (CL50-96 horas) na exposição aguda para *A. aff. bimaculatus* como sendo de 10 mg/L de zinco (Anexo 3 - Tabela 2), o dobro do permitido pela legislação brasileira, que é de 5 mg/L (CONAMA, 2005).

Nos tratamentos que receberam 10, 15 e 20 mg/L, tanto os peixes que morreram quanto aqueles que permaneceram vivos até o final das 96 horas de exposição apresentaram comportamento anormal, permanecendo próximos a superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia, ao passo que os animais que não receberam o zinco ou aqueles que receberam o metal nas concentrações de 3 ou 5 mg/L, movimentavam-se intensamente em cardumes e se alimentavam normalmente, mostrando comportamento característico da espécie.

Nos tratamentos em que a concentração de zinco na água foi superior a 10 mg/L, o acúmulo desse metal foi maior no fragmento ósseo, seguido de testículo, e músculo (Figura 1). Não há dados relatando acúmulo de Zn em tecido ósseo.

Papagiannis *et al.*, (2004) coletaram quatro espécies de peixes do lago Pamvotis (Grécia), e verificaram que as maiores concentrações de cobre e zinco ocorreram no fígado, seguido por gônadas e músculo. No entanto, esses peixes sofreram exposição crônica, diferentemente do ocorrido no presente experimento em que a exposição foi aguda, o que pode explicar as diferenças obtidas para o acúmulo do Zn nos diferentes órgãos e tecidos. Acúmulo significativo de Zn nos ossos foi verificado apenas nas doses acima de 5 mg/L (Figura 1).

Na determinação do acúmulo de zinco nos tecidos dos peixes, não houve diferença significativa para concentração no músculo. No fígado, houve acúmulo de Zn nos animais tratados com 10 mg/L, especialmente naqueles

peixes que se mantiveram vivos até o final do período experimental. Apenas animais submetidos a concentrações de zinco de 10 mg/L apresentaram acúmulo hepático desse metal, sendo que tanto os tratamentos cujas concentrações foram inferiores quanto às superiores, não apresentaram acúmulo. A possível justificativa pode decorrer da capacidade dos peixes em metabolizar e excretar xenobióticos, e nestas dosagens não atingiu uma concentração tóxica. Nos tratamentos com dosagens superiores a 10 mg/L ocorreu a rápida mortalidade dos peixes, não havendo tempo hábil para acúmulo nos tecidos. Apesar disso, houve alterações na morfologia do órgão, mesmo não havendo acúmulo do metal (Figura 1).

Nos peixes dos tratamentos controle e aqueles que receberam 3 e 5 mg/L de zinco, não foi observado acúmulo significativo do metal nos ossos, provavelmente devido a essencialidade desse oligoelemento à nutrição dos animais. Dessa forma, nas menores concentrações, o zinco foi metabolizado ou excretado, não caracterizando toxicidade aos peixes. Os tratamentos de maior concentração (10, 15 e 20 mg/L) diferiram estatisticamente do grupo controle (Figura 1). Hogstrand & Wood (1995) demonstraram que um dos mais importantes efeitos subletais do Zn^{2+} em peixes é a inibição da absorção de cálcio (Ca^{2+}), já que estes íons competem pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias. Conseqüentemente, o excesso de zinco pode levar a hipocalcemia. Então, uma redução na concentração de cálcio seria prejudicial ao organismo, já que este elemento é essencial para a integridade da membrana celular e na estabilização da permeabilidade branquial (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

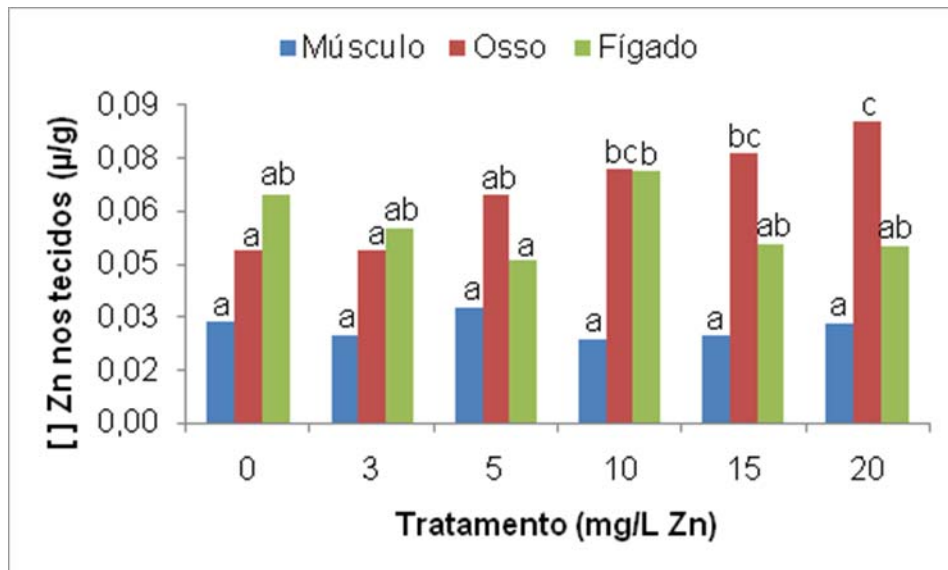


Figura 1. Concentração de zinco nos tecidos (músculo, osso e fígado) de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a diferentes concentrações de zinco na água.

*Letras iguais sobre colunas de mesma cor não diferem entre si pelo teste de tukey a 5% de probabilidade.

Histologicamente, o fígado de *A. aff. bimaculatus* se caracteriza por uma distribuição cordonal dos hepatócitos e os sinusóides se encontram irregularmente distribuídos entre as células hepáticas, sendo revestidos por células endoteliais. Os hepatócitos apresentavam citoplasma claro com um ou dois núcleos centrais e formato arredondado, e em algumas regiões deslocados para a periferia da célula (Figura 2). Estas descrições morfológicas estão de acordo com Grizzle e Rogers (1985) para o bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), de Souza *et al.*, (2001) e Fujimoto *et al.*, (2008) para o pacu (*Piaractus mesopotamicus*).

As alterações histopatológicas encontrados foram: congestão vascular; diminuição do volume celular; deslocamento de núcleo do hepatócito; necrose; desarranjo da estrutura cordonal; infiltrado leucocitário e vacuolização (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7).

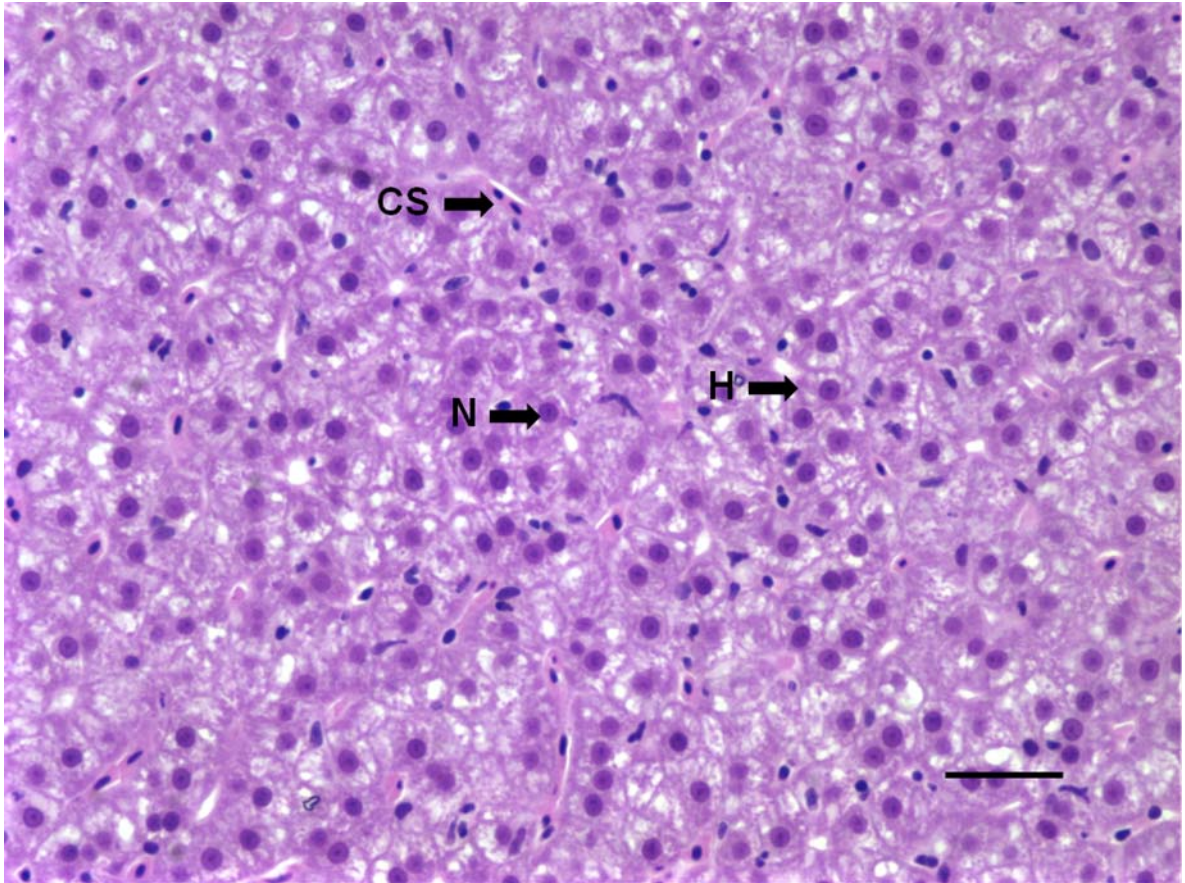


Figura 2. Fotomicrografia da organização estrutural do tecido hepático *A. aff. bimaculatus* do grupo controle. (N) núcleo do hepatócito, (CS) capilar sinusóides, (H) hepatócito. Barra = 30 μ m. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B.

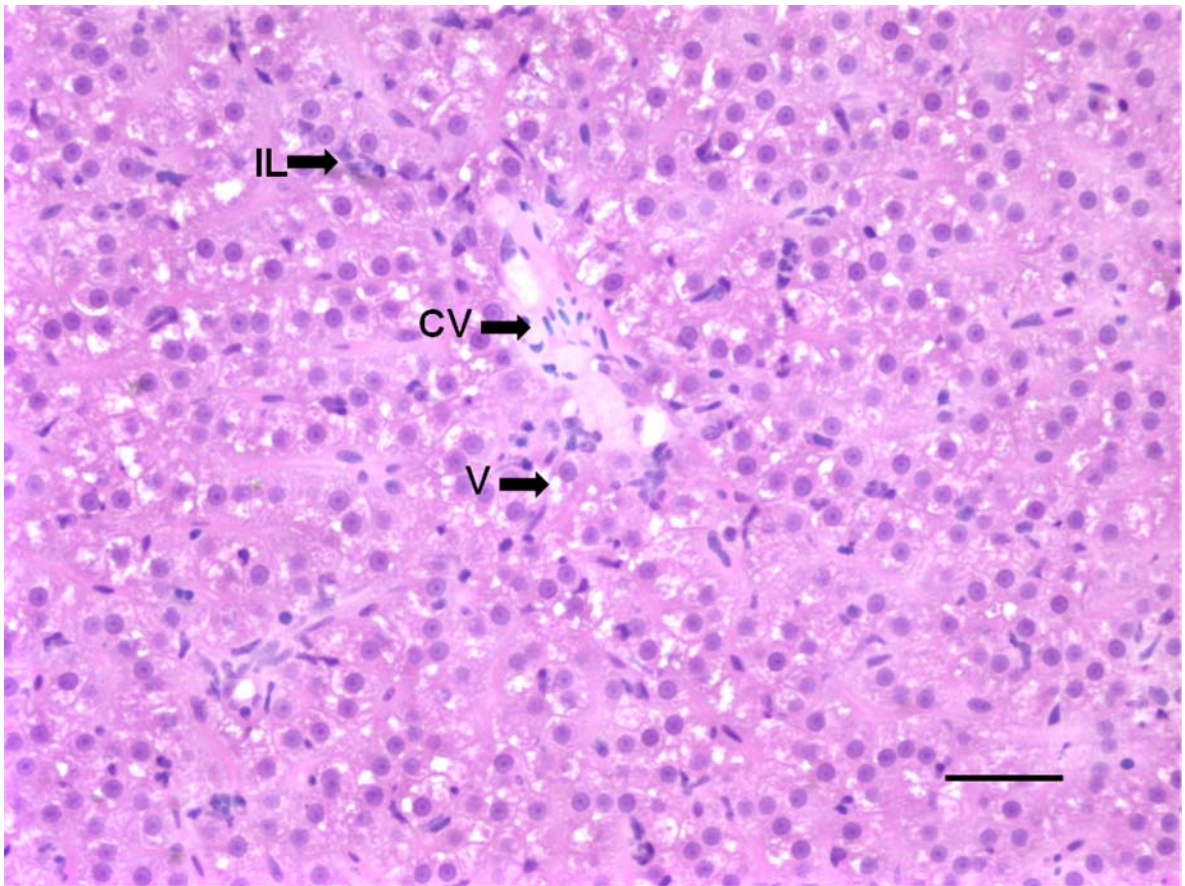


Figura 3. Fotomicrografia da organização estrutural do tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentração de 5 mg/L de zinco na água. CV = congestão vascular; IL = infiltrado leucocitário; V = vacuolização. Barra = 30 μ m. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B.

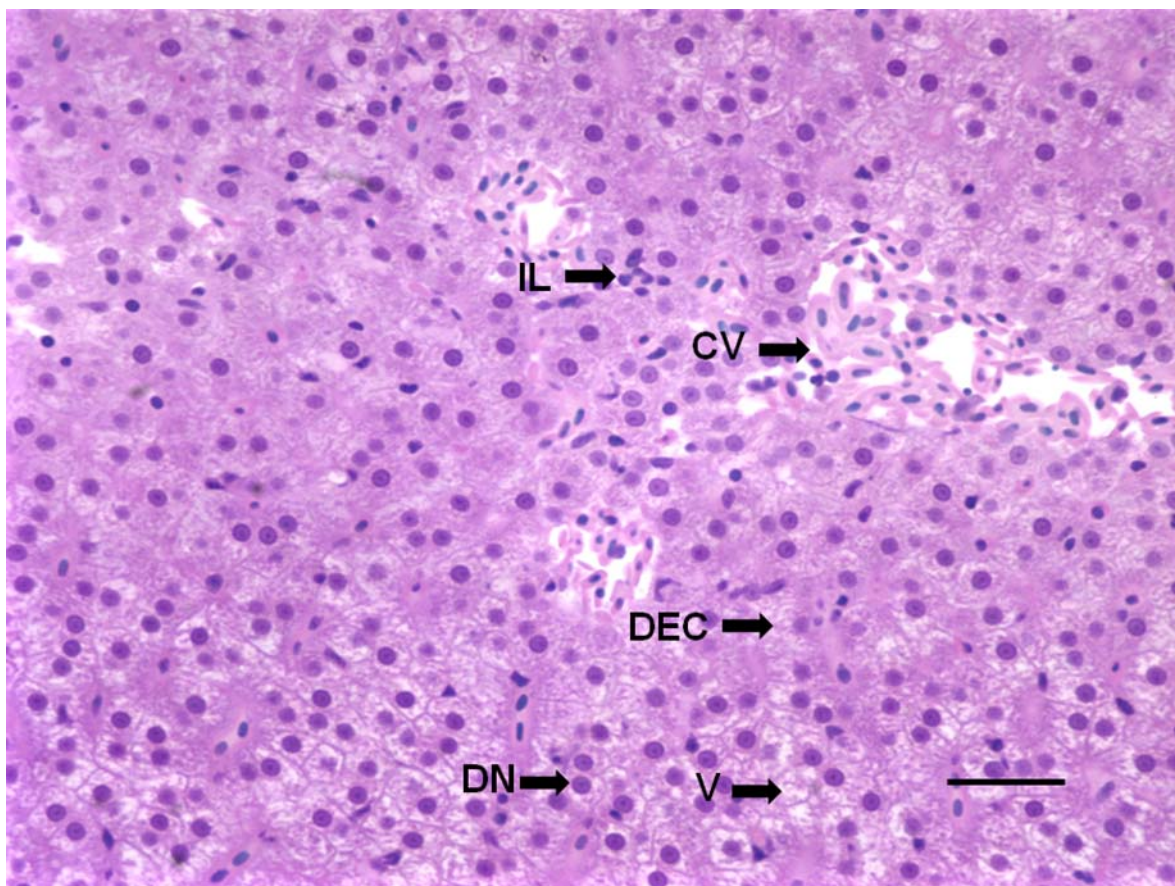


Figura 4. Fotomicrografia da organização estrutural do tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* exposto a concentrações de 5 mg/L de zinco na água.

CV = congestão vascular; DN = deslocamento de núcleo; DEC = desarranjo da estrutura cordonal; IL = infiltrado leucocitário; V = vacuolização. Barra = 30 μ m. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B.

Nos peixes dos tratamentos que receberam 3 e 5 mg/L de zinco, ocorreram semelhantes desarranjos das estruturas cordonais dos hepatócitos. Nos tratamentos com concentrações superiores, essa patologia foi de 70% (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7). Essas alterações podem indicar a degeneração inicial dos processos intracelulares dos hepatócitos, pois o fígado realiza importantes funções no processo de desintoxicação do animal (DUTTA *et al.*, 1993; HASCHEK; ROUSSEAU, 1996). A desorganização do arranjo cordonal também foi observada em bagre (*Heteropneustes fossilis*) exposto ao malation (DUTTA *et al.*, 1993) e em dourada (*Sparus auratus*), exposto ao detergente dodecil sulfato de sódio (RIBELLES *et al.*, 1995).

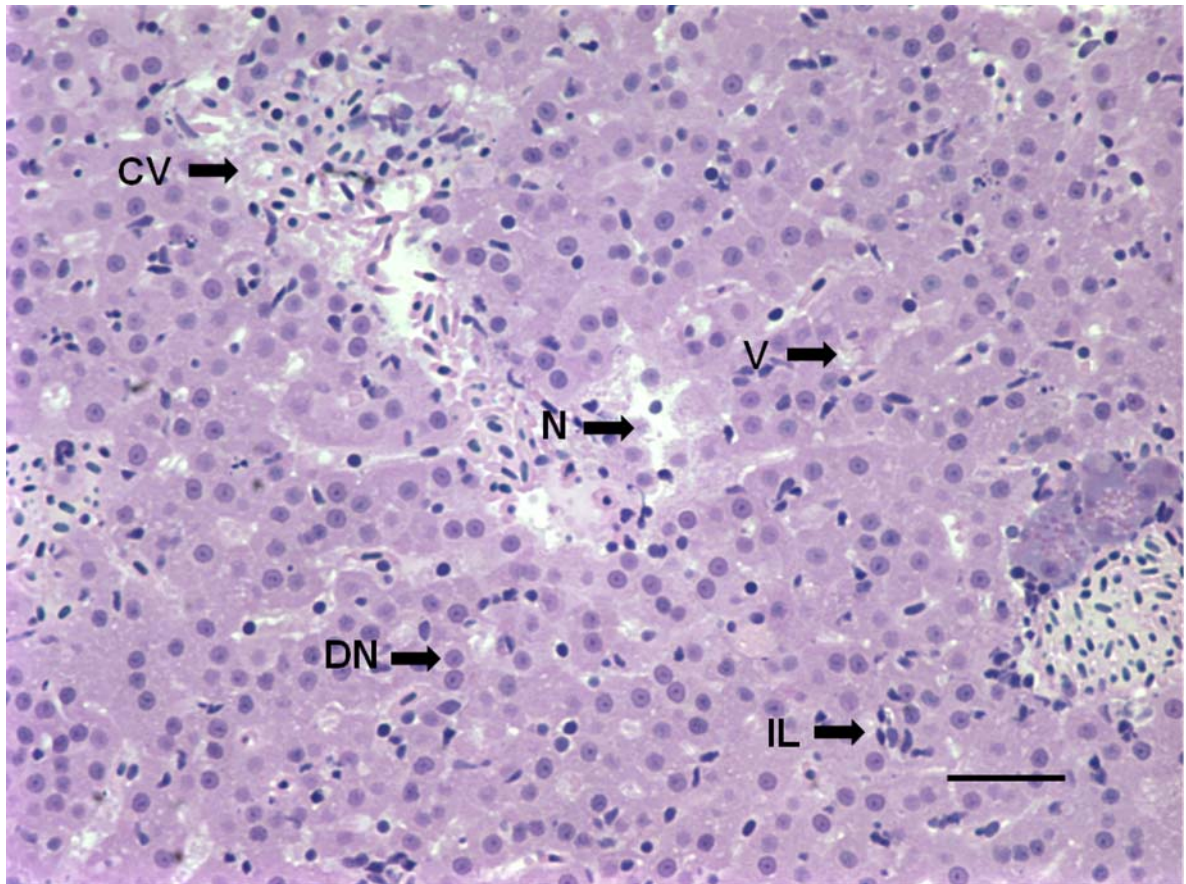


Figura 5. Fotomicrografia da organização estrutural do tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 10 mg/L de zinco na água.

CV = congestão vascular; DN = deslocamento de núcleo; IL = infiltrado leucocitário; V = vacuolização; N = necrose. Barra = 30 µm. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B.

Verificou-se congestão vascular hepática nos peixes, a partir do tratamento com 3 mg/L de zinco, havendo aumento progressivo, chegando a 100% nos tratamentos expostos a concentração superior a 10 mg/L (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7). A congestão vascular dos sinusóides ou em veias pequenas é uma mudança patológica que ocorre no fígado. Células hepáticas na área adjacente podem sofrer atrofia em casos severos de congestão (VERLAG, 1982). Essa alteração é definida como o acúmulo de sangue causando dilatação dos vasos sanguíneos (ROBERTS, 1989). Este distúrbio circulatório está relacionado com a diminuição da velocidade de circulação de sangue no local. Em grandes proporções, causa diminuição das trocas

metabólicas entre o plasma sanguíneo e o tecido, causando danos às células locais. Gül *et al.* (2004), investigando a histopatologia hepática em peixe de água doce de áreas poluídas, observaram congestões vasculares, além de degenerações gordurosas micro e macro-vesiculares. Os autores associaram essas lesões com a ação tóxica de poluentes.

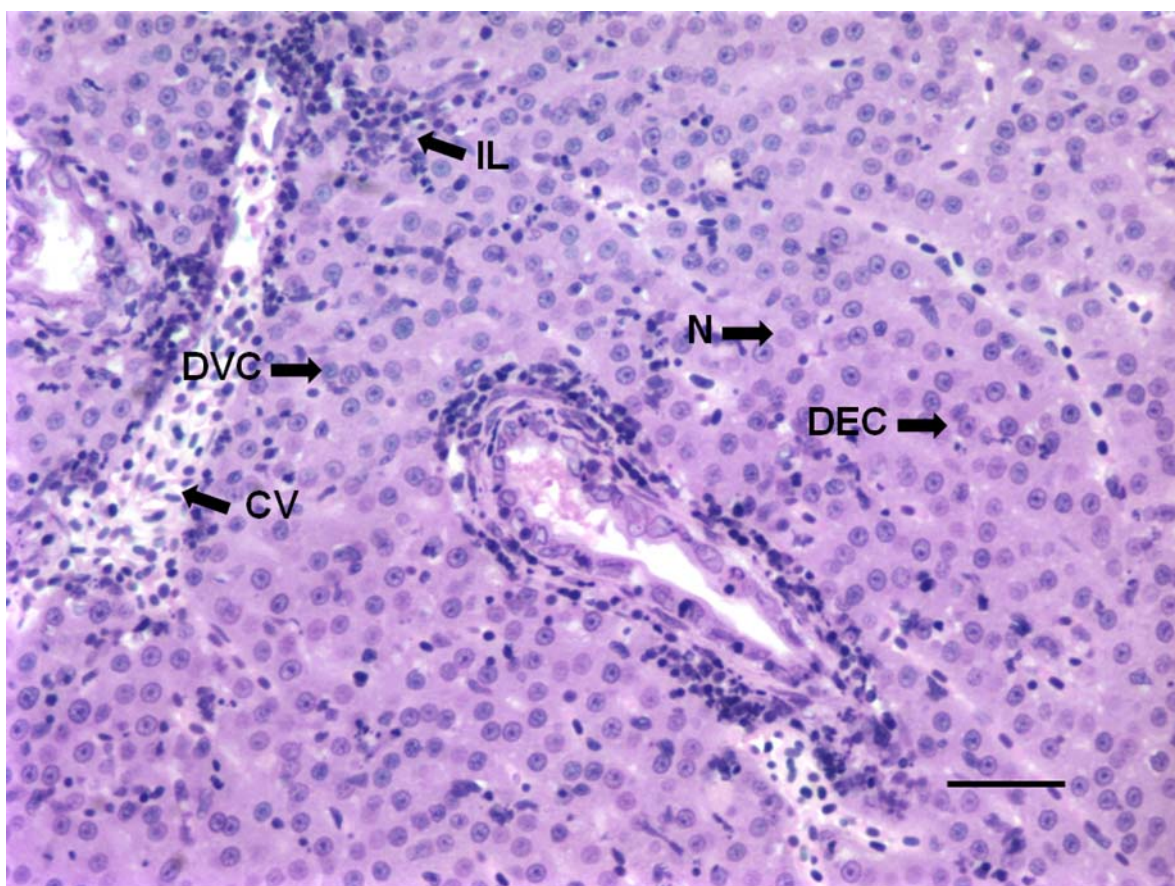


Figura 6. Fotomicrografia da organização estrutural do tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 15 mg/L de zinco na água.

CV = congestão vascular; DVC = diminuição do volume celular; N = necrose; DEC = desarranjo da estrutura cordonal; IL = infiltrado leucocitário; Barra = 30 μ m. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B.

No tratamento em que os peixes não foram expostos ao zinco e naquele onde os peixes foram submetidos à exposição aguda de 3 mg/L, não foram identificadas áreas com necrose. Entretanto, na exposição dos peixes a 10, 15 e 20 mg/L de zinco, houve necrose do tecido hepático em 50% ou mais dos animais (Tabela 1 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7). A necrose pode ser caracterizada por

alterações nucleares e citoplasmáticas, seguidas de perda dos limites celulares (ROBERTS, 1989). Ao ocorrer necrose de uma célula há liberação de sinalizadores que induzem a proliferação celular para a substituição das células mortas para retornar a condição estrutural e funcional do tecido. Este tipo de lesão causa prejuízos funcionais e estruturais no fígado de peixes (STENTIFORD *et al.*, 2003), diminuindo a funcionalidade, podendo causar a falência do órgão e conseqüentemente afetar maiores níveis de organização biológica (RABITTO *et al.*, 2005). A necrose ainda pode indicar degeneração de proteínas estruturais na membrana dos hepatócitos, podendo trazer problemas teciduais, pois segundo Pacheco e Santos (2002), as proteínas estruturais de membrana mantêm o parênquima hepático como um tecido compacto e homogêneo.

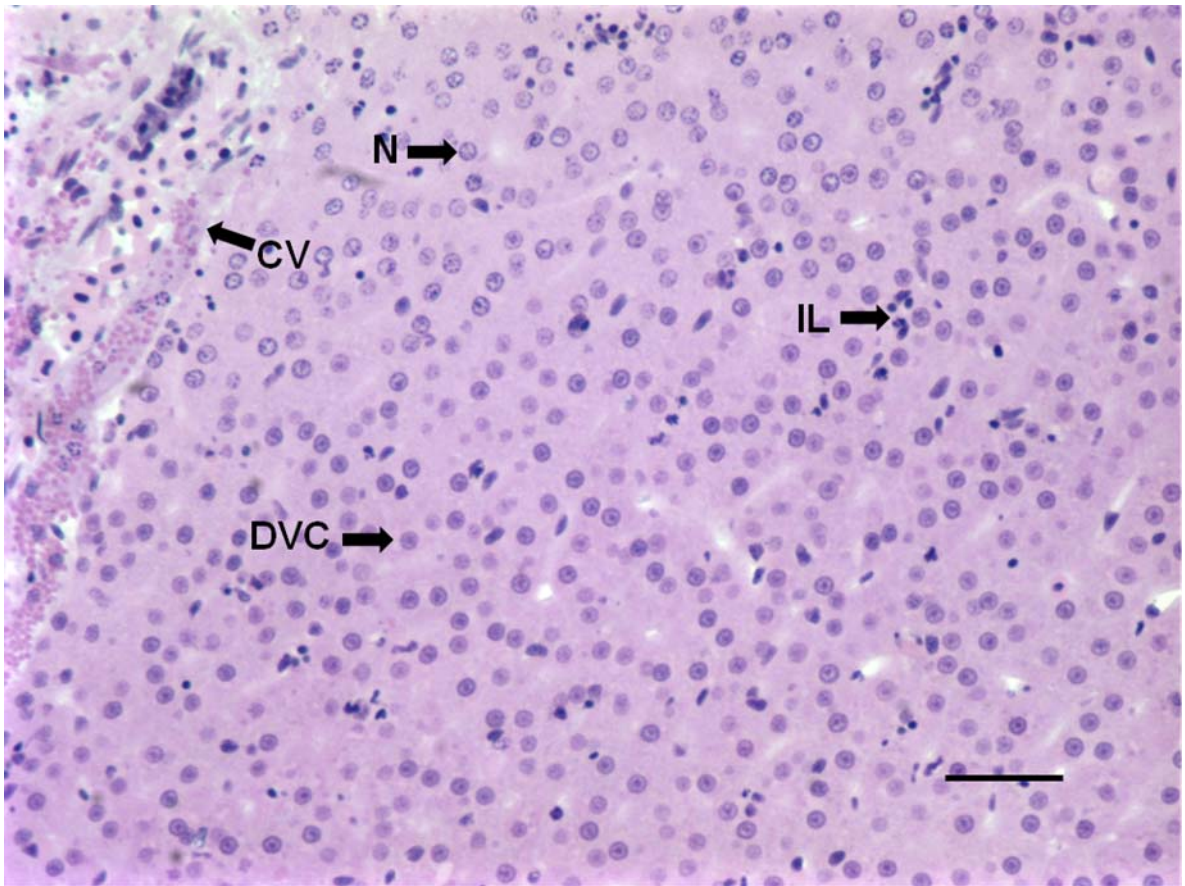


Figura 7. Fotomicrografia da organização estrutural do tecido hepático de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 20 mg/L de zinco na água.

CV = congestão vascular; DVC = diminuição do volume celular; N = necrose; IL = infiltrado leucocitário. Barra = 30 µm. Coloração hematoxilina de Mayer e Floxina B.

Tabela 1: Percentual de alterações histopatológicas detectadas no fígado de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de zinco.

Concentração de zinco (mg/L)	Histopatologias hepática (%)						
	CV	DVC	DN	N	DEC	IL	V
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	41,7	100,0	33,3	0,0	41,7	41,7	16,7
5	66,6	100,0	100,0	8,3	50,0	83,3	25,0
10	100,0	100,0	100,0	50,0	70,0	83,3	66,7
15	100,0	100,0	100,0	50,0	70,0	100,0	41,7
20	100,0	100,0	100,0	58,3	70,0	100,0	75,0

Legenda: CV= congestão vascular; DVC= diminuição do volume celular; DN= deslocamento de núcleo; N= necrose; DEC= desarranjo da estrutura cordonal; IL= infiltrado leucocitário; V= vacuolização.

Houve aumento progressivo no percentual de núcleos de hepatócitos acompanhado da redução do percentual de citoplasma, indicando aumento da população celular hepática. Essas características foram observadas em todos os animais que entraram em contato com o sulfato de zinco quando comparados ao grupo controle (Tabela 2 e Figuras 3, 4, 5, 6, 7). Gül *et al.* (2004), investigando a histopatologia hepática em peixe de água doce de áreas poluídas, observaram extensa proliferação de hepatócitos e sugeriram que essa alteração foi indicativo da ação tóxica de poluentes.

O aumento crescente da área ocupada por capilares sinusóides e de infiltração leucocitária ainda que leve, mas constante, confirma a toxicidade do zinco. Em presença de contaminantes químicos, considerados agressivos, há um aumento da irrigação do tecido, para aumentar a quantidade de células do sistema imune circulante no local afetado. Infiltração leucocitária também foi observada por Rodrigues & Fanta (1998), estudando a ação de organofosforado em paulistinha (*Brachydanio rerio*). Eller (1971), estudando a exposição crônica de inseticida Endrin em de trutas "cutthroat" (*Salmo clarki*), também verificou a ocorrência de infiltrado leucocitário no fígado dos peixes.

Santos *et al.*, (2004) constataram que tecidos hepáticos de tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) coletadas na represa de Guarapiranga, SP, apresentaram os hepatócitos com núcleos picnóticos progredindo para uma condição de cariólise, citoplasma com granulações densas e focos de degeneração, células leucocitárias no interior de sinusóides, vasos marginais e infiltrados, sugerindo a ocorrência de um possível processo inflamatório. Segundo esses autores, as alterações encontradas devem estar relacionadas à ação de substâncias tóxicas ou xenobióticas presentes na água da represa.

Tabela 2: Percentual da constituição tecidual detectadas no fígado de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de zinco.

Concentrações de zinco (mg/L)	Constituição Tecidual (%)			
	Núcleo	Citoplasma	Capilar Sinusóide	Infiltrado Leucocitário
0	10,8	76,7	12,3	0,1
3	12,4	72,6	14,7	0,2
5	14,0	65,7	19,6	0,6
10	17,7	55,3	26,2	0,7
15	22,7	46,3	29,1	1,7
20	20,9	48,3	28,9	1,8

Houve redução do diâmetro nuclear dos hepatócitos em relação ao aumento da concentração de zinco. Estatisticamente, houve diferença entre os animais que foram expostos ao zinco comparados aos animais controle. No tratamento em que se utilizou a maior concentração de zinco, houve rápida mortalidade dos peixes (24 horas), e mesmo neste pequeno tempo de exposição, os animais apresentaram grande redução no diâmetro nuclear dos hepatócitos (Tabela 3). Este resultado pode, possivelmente, estar ligado aos mecanismos que regulam a multiplicação dos hepatócitos e à maior incidência de necrose levando à morte celular e induzindo o aumento da proliferação dos hepatócitos para reposição celular do tecido lesado. Gül *et al.*, (2004) investigando a histopatologia hepática em peixe de água doce de áreas

poluídas, observaram extensa proliferação de hepatócitos e sugeriram que essa alteração foi indicativo da ação tóxica de poluentes.

Tabela 3: Diâmetro nuclear de hepatócitos de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de zinco.

Concentração de zinco (mg/L)	Diâmetro Nuclear de hepatócitos (µm)
0	5,50 a
3	5,06 b
5	4,84 bc
10	4,76 bc
15	4,81 bc
20	4,66 c
CV (%)	6,67

Letras iguais na mesma coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

A Resolução CONAMA n° 357 de 17/03/2005, estabelece o valor máximo de 5 mg/L de Zn^{2+} para água própria para a criação de animais (CONAMA, 2005). No entanto, de acordo com este estudo essa concentração de zinco na água comprometeu as funções fisiológicas do fígado da espécie havendo, portanto, a necessidade de revisão desta legislação brasileira. O aumento no número de hepatócitos é um indicativo de mecanismo compensatório para restabelecimento da homeostase em função dos efeitos tóxicos do zinco.

CONCLUSÕES

O zinco mostrou-se altamente tóxico para *A. aff. bimaculatus*, em exposição aguda mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira para criação animais.

A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao zinco provocou alterações histopatológicas ao fígado, sendo essas patologias diretamente

correlacionadas com o aumento da concentração de zinco em que os animais foram expostos.

Houve maior acúmulo de zinco no tecido ósseo seguido do hepático. A musculatura não apresentou acúmulo significativo.

Pôde-se estimar a CL50-96 horas na exposição aguda para *A. aff. bimaculatus* como sendo de aproximadamente 10 mg/L de zinco.

O *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando exposto a baixas concentrações de zinco na água, e, portanto, é adequado como bioindicador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERTOLETTI, E. **Ensaio biológicos com organismos aquáticos e suas aplicações no controle da população**. São Paulo. Apostila CETESB. 50p 1990.

CELIK, U.; OEHLENSCHLAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, v.87, p.343-347, 2004.

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

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

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

ELLER, L.L. Histopathological lesions in cutthroat trout, *Salmo clarki*, exposed chronically to the insecticide endrin. **The American Journal of Pathology**. v.64, p.321-336, 1971.

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

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

FUJIMOTO, R.Y.; CRUZ, C.; MORAES, F.R. Análise de efluente e histologia da pele, fígado e rim de pacus (*Piaractus mesopotamicus*) suplementados com cromo trivalente. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, n.1, p.117 - 124, 2008.

GRIZZLE, J.M., ROGERS, W.A. **Anatomy and Histology of the Channel Catfish**. ed Auburn University, Auburn, Alabama, 1985, 94p.

GÜL, S.; BELGE-KURUTAS, E.; YILDIZ, E.; SAHAN, A.; DORAN, F. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. **Environment International**, v.30, p.605–609, 2004.

HASCHEK, W.M.; ROUSSEAU, C.G. **Handbook of toxicologic pathology**. London: Academic Press, 1996, p.127-151.

HEATH, A.G. **Water Pollution and Fish Physiology**. C.R.C. Press, 1987, 359p.

HINTON, D.E.; BAUMANN, P.C.; GARDNER, G.R.; HAWKINS, W.E.; HENDRICKS, J.D.; MURCHELAN, R.A.; OKIHIRO, M.S. **Biomarkers:**

Biochemical, Physiological, and histopathological markers of anthropogenic stress. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992, p.155-208.

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

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

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

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes.** 3. ed. Jundiaí: F. Kubitza. 97p., 1999.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) **A bacia do rio Tibagi.** Londrina: 2002. Cap.29, p.551 – 577.

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

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

MUNTEANU, V.; MUNTEANU, G. Biomonitoring of mercury pollution: A case study from the Dniester River. **Ecological Indicators**. n.7, p.498-496, 2007.

NIGRO, M.; FALLENI, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine

environments: Transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**. v.77, n.4, p.339-347, 2006.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Research**. v.90, p.217-225, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; VOLLAIRE, Y.; SANCHEZ-CHARDI, A.; ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**. v.74, n.1, p.53-69, 2005.

OYAKAWA, T.O.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. **Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Neotrópica, 2006, 201p.

PACHECO, M.; SANTOS, M.A. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.53, p.331 – 347, 2002.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, v.30, p.357-362, 2004.

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

RABITTO, I.S.; ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.60, p.147-156. 2005.

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

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

ROBERTS, R.J. **Fish pathology**. 2 ed. London: Braillière Tindall, 1989, 467p.

RODRIGUES, E.L. e FANTA, E. Liver histopathology of the fish *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchman after acute exposure to sublethal levels of the organophosphate Dimethoate 500. **Revista brasileira de Zoologia**. v.15, p.441-450, 1998.

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

SANTOS , A.A.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; FELIZARDO, N.N.; RODRIGUES, E.L. Análise histopatológica de fígado de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, criada em tanque-rede na Represa de Guarapiranga, São Paulo, SP, Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.30, n.2, p.141 - 145, 2004.

SOUZA, V.L.; LUNARDI, L.O.; VASQUES, L.H.; CASALETI, L.; NAKAGHI, L.S.O.; URBINATI, E.C. Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v.18, n.1, p.15-20, 2001.

STENTIFORD, G.D.; LONGSHAW, M.; LYONS, B.P.; JONES, G.; GREEN, M.; FEIST, S.W. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. **Marine Environmental Research**, v.55, n.2, p.137-159, 2003.

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

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

VERLAG, G.F. **An atlas of fish histology: normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha, 1982, 147p.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences**. v.1, p.295. 1989.

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

CAPÍTULO 3

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM TESTÍCULO DE *Astyanax aff. bimaculatus* CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO AGUDA AO ZINCO

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, estando suscetíveis às ações de contaminantes aéreos, por deposições atmosféricas e contaminantes terrestres que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento dos poluentes pelas chuvas. O desenvolvimento do aparelho reprodutivo é um processo contínuo durante a ontogenia e conseqüentemente está sujeito ao efeito de estressores ambientais em todas as fases do ciclo de vida. Neste contexto, com este trabalho propôs-se estudar os efeitos de diferentes concentrações de zinco na histologia de testículos de indivíduos adultos de lambaris (*Astyanax aff. bimaculatus*), após exposição aguda. Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus* adultos divididos em cinco grupos de tratamentos e grupo controle com 12 repetições. Os tratamentos foram cinco concentrações de zinco: 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L. A pesquisa foi desenvolvida no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, laboratório de Morfofisiologia de Peixes. Após o tempo de exposição de 96 horas, os animais foram eutanasiados, pesados, medidos e retirado fragmentos de testículo, músculos e ossos. Fragmentos de testículo foram fixados, incluídos, seccionados em micrótomo rotativo e corados para confecção de lâminas. Fragmentos de osso, fígado e testículo foram desidratados e digeridos para quantificação da absorção do zinco. Durante o período experimental a água dos aquários apresentou-se com características físico-químicas dentro dos limites considerados aceitáveis para oxigênio dissolvido, pH, amônia tóxica, condutividade elétrica, dureza total e temperatura. Pôde-se estimar a CL50-96 horas na exposição aguda como sendo de 10 mg/L de zinco. O zinco mostrou-se altamente tóxico, em exposição aguda mesmo na concentração permitida pela legislação brasileira. As principais alterações evidenciadas nas gônadas expostas ao zinco foram ruptura de cisto, retardo no desenvolvimento das

células da linhagem germinativa, núcleo picnótico, aglomerado celular, descolamento da parede dos cistos e vacuolização. O zinco comprometeu as funções reprodutivas da espécie em estudo, sendo mais graves nos tratamentos expostos às maiores concentrações deste metal. O retardo do desenvolvimento dos cistos levou à redução na produção de espermatozóides, podendo comprometer a taxa de fecundidade e conseqüentemente na manutenção dos estoques populacionais.

PALAVRAS-CHAVE: Efeitos toxicológicos; lambaris; gônadas; metal pesado.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a degradação dos ecossistemas aquáticos tem ocorrido de forma contínua devido aos múltiplos impactos ambientais provenientes das atividades antrópicas como a mineração, os despejos de efluentes domésticos e industriais sem tratamento e uso inadequado do solo em regiões ripárias e planícies de inundação e várzeas (GUERESCHI, 2004). Despejos urbanos, agrícolas e industriais representam as principais fontes de contaminação em rios, estuários e oceanos (DE LA TORRE *et al.*, 2005; NIGRO *et al.*, 2006).

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente, estando suscetíveis as ações de contaminantes aéreos, por deposições atmosféricas e contaminantes terrestres que atingem os ambientes aquáticos através do escoamento dos poluentes pelas chuvas (VALDEZ DOMINGOS, 2006).

Os metais pesados apresentam potencial tóxico comprovado, ou seja, são capazes de induzir efeitos deletérios aos organismos vivos expostos (RAINBOW; DALLINGER, 1993). Alguns metais como cobre, ferro, zinco e cobalto, são considerados elementos essenciais aos processos biológicos, mas podem ser tóxicos quando presentes em concentrações mais elevadas (KENNISH, 1991; HEATH, 1995).

O zinco é classificado como micronutriente sendo, em alguns casos, requerido para desempenhar função celular (KARAN *et al.*, 1998; MCGEER *et al.*, 2000). Porém, em concentrações elevadas pode se tornar tóxico especialmente aos peixes e outros organismos aquáticos (ROMANI *et al.*, 2003; CELIK & OEHLENSCHAGER, 2004). Isto ocorre porque os organismos podem bioacumular metais pesados, incorporando-os na cadeia trófica e atingindo grande parte dos diferentes estratos que constituem os ecossistemas aquáticos (VIARENGO, 1989).

A compreensão detalhada dos efeitos dos diferentes tipos de efluentes nos corpos d'água receptores é essencial para o controle da poluição (MARTINEZ; CÓLUS, 2002).

Bioindicadores são espécies de organismos vivos cujas características favorecem sua utilização na avaliação da saúde de um determinado ecossistema (RADTKE, 1979). O termo biomarcador refere-se a órgãos específicos que sofrem alterações morfológicas e funcionais nas células e ou tecidos em consequência da exposição a um contaminante (HINTON; LAURÉN, 1990).

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

A organização básica do testículo é comum a todos os peixes e aos demais vertebrados. Este órgão tem as funções espermatogênica e androgênica, possuindo dois compartimentos principais: o intersticial e o 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 esteroideogênica. A produção de andrógenos é importante para a diferenciação sexual, o desenvolvimento das características sexuais secundárias e comportamento sexual, e para a regulação da espermatogênese (WELTZIEN *et al.*, 2004). O compartimento tubular contém células somáticas (células de Sertoli) e células germinativas, que irão formar os espermatozoides após passarem por um processo bastante complexo e altamente organizado – a espermatogênese (BILLARD, 1990; KOULISH *et al.*, 2002).

Exceto pelo arranjo cístico, no qual as células germinativas se desenvolvem de forma sincronizada, provavelmente devido à presença de pontes intercelulares (GRIER, 1993; RUSSELL *et al.*, 1990; KOULISH *et al.*, 2002), o processo espermatogênico de teleósteos assemelha-se muito ao de mamíferos. Durante a fase proliferativa ou espermatogonial, a espermatogônia

primária ou tipo A se divide e origina espermatogônias secundárias ou do tipo B que, depois de um número variável de divisões mitóticas conforme a espécie, diferenciam-se em espermátocitos primários, iniciando a fase meiótica ou espermatocitária. Após a primeira divisão meiótica formam-se os espermátocitos secundários haplóides que, num curto intervalo de tempo, originam as espermatídes através da segunda divisão meiótica. Em seguida, ocorre a fase espermiogênica ou de diferenciação na qual as espermatídes se transformam em espermatozóides (SILVA, 1987).

O desenvolvimento do aparelho reprodutivo é um processo contínuo durante a ontogenia e conseqüentemente está sujeito ao efeito de estressores ambientais em todas as fases do ciclo de vida (HOAR; RANDALL, 1969).

Poluentes como metais pesados, derivados do petróleo, esgotos domésticos ou industriais e agrotóxicos, alcançam no ambiente alterando não só o ecossistema, mas também organismos vivos, nos quais as moléculas dos tóxicos geram distúrbios nas células, promovendo alterações de membrana que refletem no ciclo celular nas suas diferentes etapas (NAZ, 1999).

A exposição a substâncias tóxicas em diferentes fases do ciclo de vida tem como características gerais, relacionadas ao aparelho reprodutor, o retardamento de fases de desenvolvimento e da maturação gonadal, a redução no número e viabilidade de gametas, histopatologias e a redução do número e viabilidade de descendentes (RAND; PETROCELLI, 1985; ADAMS, 1990).

No estudo realizado por Wester & Canton (1986), citado por Hinton & Laurén (1990), sobre a diferenciação gonadal de “killifish” japonês *Oryzias latipes*, com amostras contaminadas em concentrações subletais do inseticida lindane, constatou-se a ocorrência de severas alterações morfológicas e taxas significativas de intersexualidade provocada pelo agente contaminante.

Alterações morfológicas severas ocorridas durante a diferenciação gonadal também foram diagnosticadas em populações amostrais de “Fathead minnow” (*Pimephales promelas*), paulistinha (*Brachydanio rerio*) e de guppy (*Poecilia reticulata*), quando contaminadas com concentrações subletais de cobre (RAND; PETROCELLI, 1985).

Em tilápias-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) expostas a concentrações agudas de endosulfan foi constatada redução na população de células germinativas (MONTROYA, 2008).

Em peixes coletados no Rio Piracicaba, na região do Vale do Aço – MG detectou-se altas concentrações de metais, destacando-se o zinco, devido à grande quantidade de efluente lançados pela atividade de mineração. Essa realidade aliada à escassez de dados na literatura sobre toxicologia de metais em espécies tropicais e de dados histopatológicos da toxicologia do zinco em peixes, motivou a realização desse trabalho.

Neste contexto, propôs-se estudar os efeitos da exposição aguda ao zinco, em diferentes concentrações, no testículo de indivíduos adultos de lambaris (*A. aff. bimaculatus*), utilizando análises morfológicas e morfométricas.

MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, sob protocolo com número 36/2008.

Foram utilizados 72 machos de *A. aff. bimaculatus*, colhidos aleatoriamente aos 70 dias pós-desova, na Piscicultura do Prata, Eugenópolis – MG, na bacia do rio Paraíba do Sul. A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Morfofisiologia de Peixes do Departamento de Veterinária, nos Laboratórios de Biologia Estrutural e de Aplicação de Radioisótopos do Departamento de Biologia Geral e no Laboratório de Espectrofotometria de Absorção Atômica do Departamento de Química, na Universidade Federal de Viçosa, MG.

No período de adaptação foram utilizados aquários de vidro, com capacidade de 150 L de água, livre de cloro (por decantação) e temperatura controlada (26 ± 1 °C) através de aquecedores e termostatos (Atman 150 W), mantendo-se 12 peixes por aquário, durante 40 dias. Todos os aquários contaram com sistema de filtragem por britas de diferentes tamanhos e uma malha acrílica, com sistema de filtração com bombas (Sarlo Better 650 L/h), e aeração contínua da água. Diariamente, cerca de 20% do volume de água dos

aquários era sifonado, para eliminar restos de matéria orgânica, e imediatamente substituída, mantendo-se as mesmas características iniciais.

A qualidade da água foi monitorada a cada 24 horas, medindo-se o oxigênio dissolvido, amônia tóxica, dureza total e nitrito através de kits colorimétricos (Labcon Test – Alcon); o pH pelo medidor de pH digital portátil (Sammar 1700) e a condutividade elétrica pelo condutivímetro digital portátil (Tonka CD 840) (Anexo 2 – Tabela 2). Os valores de pH e dureza total estão de acordo com o banco de dados publicados pela FishBase para a espécie (FISHBASE, 2009). Oxigênio dissolvido e condutividade elétrica de acordo com Oyokawa *et al.*, 2006, e amônia tóxica, com Kubitza, 1999.

O fotoperíodo estabelecido foi de 12 horas-luz/12 horas-escuro controlado por temporizador.

Os peixes tiveram alimentação diária “*ad libitum*” ou até aparente saciedade com ração comercial (45% proteína bruta), oferecida em três vezes ao dia: às 8, 13 e 17 horas.

No momento da aplicação dos tratamentos os peixes apresentavam-se com peso, comprimento padrão e altura médio de 3,914 g, 5,6 e 1,8 cm, respectivamente.

Os animais foram expostos a 3, 5, 10, 15 e 20 mg/L de zinco na água, fornecido na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, e um grupo controle, durante 96 horas, em que cada peixe constituiu uma unidade experimental, com 12 repetições. Ao final da exposição, os animais foram previamente anestesiados, com solução de benzocaína 1:10000, seguido de aprofundamento da anestesia até serem eutanasiados.

Os dados biométricos foram mensurados com paquímetro digital Mitutoyo 500-144B com precisão de $\pm 0,02$ mm, tanto daqueles peixes que morreram durante o período experimental quanto daqueles que foram eutanasiados. Foram retirados fragmentos de músculo, osso e brânquias, para a determinação da concentração de zinco nestes tecidos através de espectrofotometria de absorção atômica.

Fragmentos de testículos da região mediana foram fixados em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 4 % e Paraformaldeído 4 %) por 24 horas e depois transferidos para álcool 70 %. Em seguida, foram desidratados em série

etanólica crescente, com trocas a cada 30 minutos, procedendo-se a inclusão em glicol-metacrilato (Historesin[®], Leica).

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

Para as análises histológicas do testículo foram qualificadas e quantificadas as seguintes patologias utilizando-se 10 campos/animal: ruptura de cisto, retardo de desenvolvimento gonadal, núcleo picnótico, agrupamento celular, descolamento da parede dos túbulos, vacuolização e aneurisma.

Histometricamente foram quantificados pontos coincidentes sobre cisto, intertúbulo, espermatozóides e líquido seminal, através do programa para análise de imagem Image Pro Plus, totalizando 1976 pontos por animal, sendo os resultados expressos em percentagem.

Os resultados de acúmulo de zinco nos órgãos e quantificação dos constituintes testiculares foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. Os demais resultados foram analisados de forma descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O Zn nos aquários foi monitorado diariamente, verificando-se que as concentrações deste elemento sofreram pequeno decréscimo com o desenvolvimento do experimento, permanecendo aproximadamente estáveis até o final, ou até que os animais atingissem 100 % de mortalidade (Anexo 1-Tabela 1).

Nos tratamentos controle, e em que as concentrações de zinco foram de 3, e 5 mg/L, não houve mortalidade dos peixes até o final do experimento. Com 24 horas de exposição, o tratamento que recebeu 20 mg/L apresentou 100 % de mortalidade. No tratamento que recebeu 15 mg/L, após 24 h da aplicação, 67 % dos peixes morreram, e com 72 horas de exposição, 75 % (Anexo 3 –

Tabela 2), indicando o alto nível de toxicidade do zinco para a espécie em estudo. No tratamento cuja concentração de zinco foi de 10 mg/L, a mortalidade dos peixes atingiu 50 % após 24 horas de exposição, não ocorrendo mais nenhuma morte até o final das 96 horas. Assim, pode-se estimar a Concentração Letal de 50 % dos organismos (CL50-96 horas) na exposição aguda para *A. aff. bimaculatus* como sendo de 10 mg/L de zinco na água (Anexo 3 - Tabela 2), o dobro do valor permitido pela legislação brasileira que é de 5 mg/L (CONAMA, 2005).

Nos tratamentos que receberam 10, 15 e 20 mg/L, tanto os peixes que morreram quanto aqueles que permaneceram vivos até o final das 96 horas de exposição apresentaram comportamento anormal, permanecendo próximos a superfície do aquário com intenso batimento opercular, natação descoordenada e letargia, ao passo que os animais que não receberam o zinco ou aqueles que receberam o metal nas concentrações de 3 ou 5 mg/L, movimentavam-se intensamente em cardumes e se alimentavam normalmente, mostrando comportamento característico da espécie.

Nos tratamentos em que a concentração de zinco na água foi superior a 10 mg/L, o acúmulo desse metal foi maior no fragmento ósseo, seguido de testículo. Não houve acúmulo significativo de zinco no tecido muscular (Figura 1). Na literatura não foram encontrados relatos de acúmulo de Zn em tecido ósseo.

Nos peixes dos tratamentos que não foram expostos ao zinco e os de 3 e 5 mg/L, não foram observados acúmulos significativos de zinco nos ossos, provavelmente devido a essencialidade desse oligoelemento à nutrição dos animais, desta forma nas menores concentrações, foi metabolizado ou excretado, não caracterizando toxicidade aos peixes. Apenas nos tratamentos de maior concentração (10, 15 e 20 mg/L) houve acúmulo significativo no tecido ósseo (Figura 1). Papagiannis *et al.* (2004) coletaram quatro espécies de peixes do lago Pamvotis (Grécia), e analisaram as concentrações de cobre e zinco no fígado, músculo e gônadas. Estes tecidos apresentaram concentrações significativas dos metais, sendo que o fígado apresentou maior acúmulo seguido por gônadas e músculo. Esta diferença pode ser explicada devido à forma de exposição. Neste trabalho os animais foram submetidos à

exposição aguda, enquanto que os animais do lago Pamvotis estavam submetidos à ação crônica deste metal.

Hogstrand & Wood (1995) demonstraram que um dos mais importantes efeitos subletais do Zn^{2+} em peixes é a inibição da absorção de cálcio (Ca^{2+}), já que o zinco compete pelos mesmos sítios de absorção nas brânquias. Conseqüentemente, o excesso de zinco pode levar a hipocalcemia. Então, a redução da concentração de Ca^{2+} seria prejudicial ao organismo, já que este elemento é essencial para a integridade da membrana celular e estabilização da permeabilidade branquial (DE LA TORRE *et al.*, 2000).

A concentração de zinco determinada nos testículos foi semelhante nos tratamentos controle e nas concentrações de 3, 5, 15 e 20 mg/L de zinco na água (Figura 1). Entretanto, na concentração de 10 mg/L, na qual se estimou a CL_{50} , houve diferença estatística se comparado ao controle. É provável que, como nos tratamentos de 15 e 20 mg/L houve, respectivamente, mortalidade de 75 e 100% dos peixes num tempo relativamente curto (aproximadamente 24h), não tenha havido tempo suficiente para que os peixes ficassem em contato com metal para acúmulo nesse órgão. Por outro lado, doses menores não foram suficientes para promover o acúmulo de zinco nas gônadas. Porém, no tratamento de 10 mg/L, como houve mortalidade de 50 % dos peixes e os demais permaneceram maior período (96h) em contato com o zinco, em concentração relativamente elevada, houve maior acúmulo.

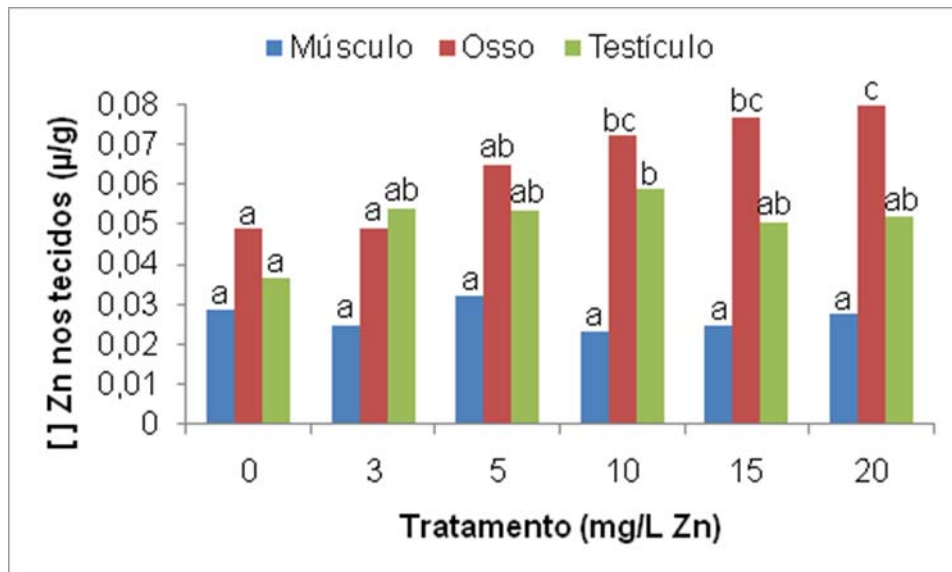


Figura 1. Acúmulo de zinco nos tecidos (músculo, osso e testículos) de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a diferentes concentrações de zinco na água.

*Letras iguais sobre colunas de mesma cor não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

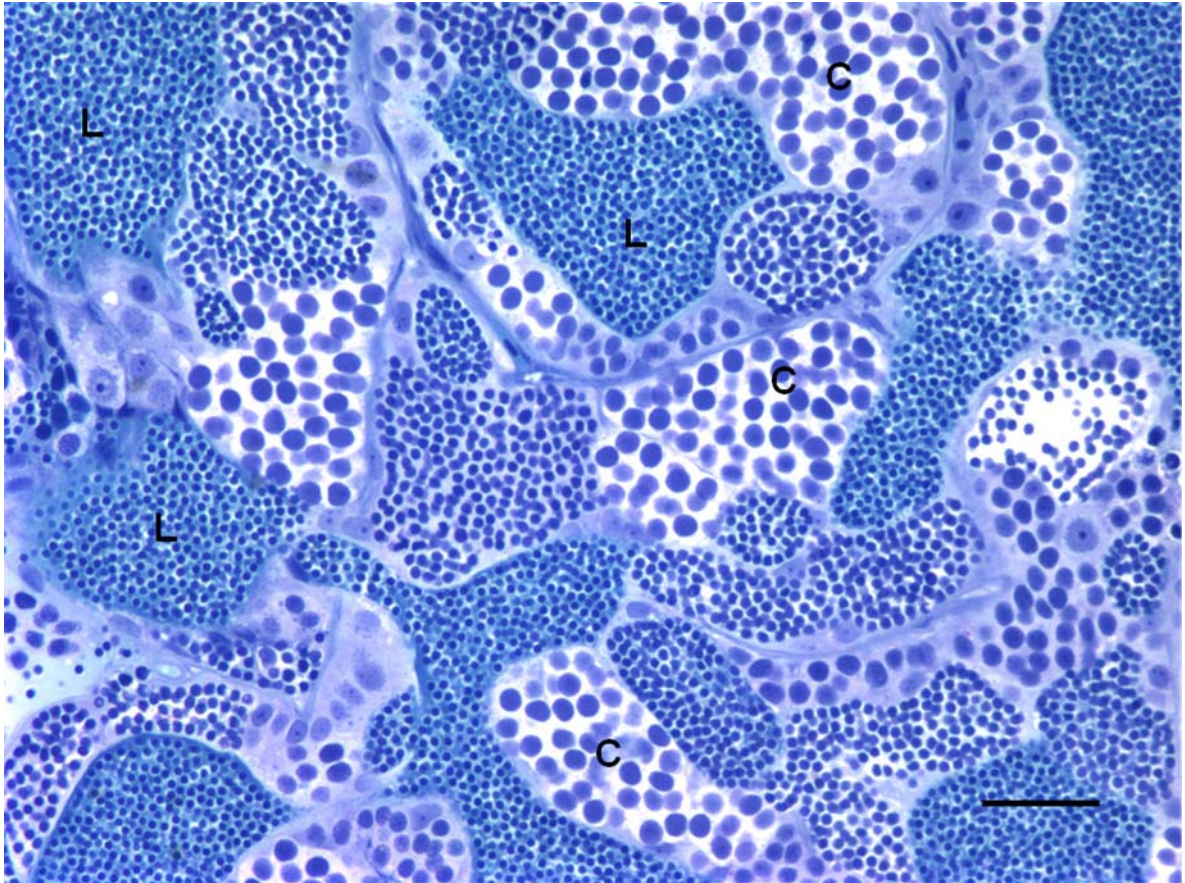


Figura 2. Fotomicrografia da organização estrutural testicular de *A. aff. Bimaculatus* do tratamento controle. C = cisto; L = lúmen tubular contendo espermatozoides e fluido testicular. Barra = 30 µm. Coloração Azul de toluidina.

Histologicamente, os testículos de *A. aff. bimaculatus* apresentam características similares às de outros teleósteos, mostrando uma organização geralmente tubular seminífera cística (RUSSELL *et al.*, 1990). As células germinativas geralmente se dividem e se diferenciam no interior de cistos germinativos, cujas paredes estão constituídas por células de Sertoli, como já descrito por diferentes autores (SILVA; GODINHO, 1983; PUDNEY, 1995; LE GAC *et al.*, 1999; SCHULZ *et al.*, 2005; PECIO *et al.*, 2007) (Figura 2).

As principais alterações evidenciadas nas gônadas expostas a concentrações de zinco foram: ruptura de cisto; retardo no desenvolvimento das células da linhagem germinativa; núcleo picnótico; aglomerado celular; descolamento da parede dos cistos e vacuolização (Tabela 1 e figuras 3, 4, 5, 6, 7).

O zinco apresentou efeito negativo sobre o desenvolvimento das células da linhagem germinativa, provocando retardo no desenvolvimento dos cistos. Nos tratamentos expostos a concentrações superiores a 3 mg/L de zinco, a quantidade de células com núcleo picnótico foi de 91,67%. Essas células possivelmente estariam em processo de apoptose (Tabela 1 e figuras 3, 4, 5, 6, 7). Yamaguchi *et al.* (2007), estudando o efeito de metais pesados em diversas espécies de peixes, observou que o processo de espermatogênese não prosseguiu além das espermatogônias, pois o mesmo foi interrompido pela morte celular. Dutta *et al.*, (2003), pesquisando o efeito dos poluentes na reprodução dos peixes, relataram a interrupção da fase de proliferação na espermatogênese do “bluegill” (*Lepomis macrochirus*) após exposição aguda ao diazinon, inseticida organofosforado. Exposições crônicas ao cádmio geraram inibição da espermatogênese em truta (*Oncorhynchus mykiss*) e em guppy (*Poecilia reticulata*) (BILLARD *et al.*, 1978).

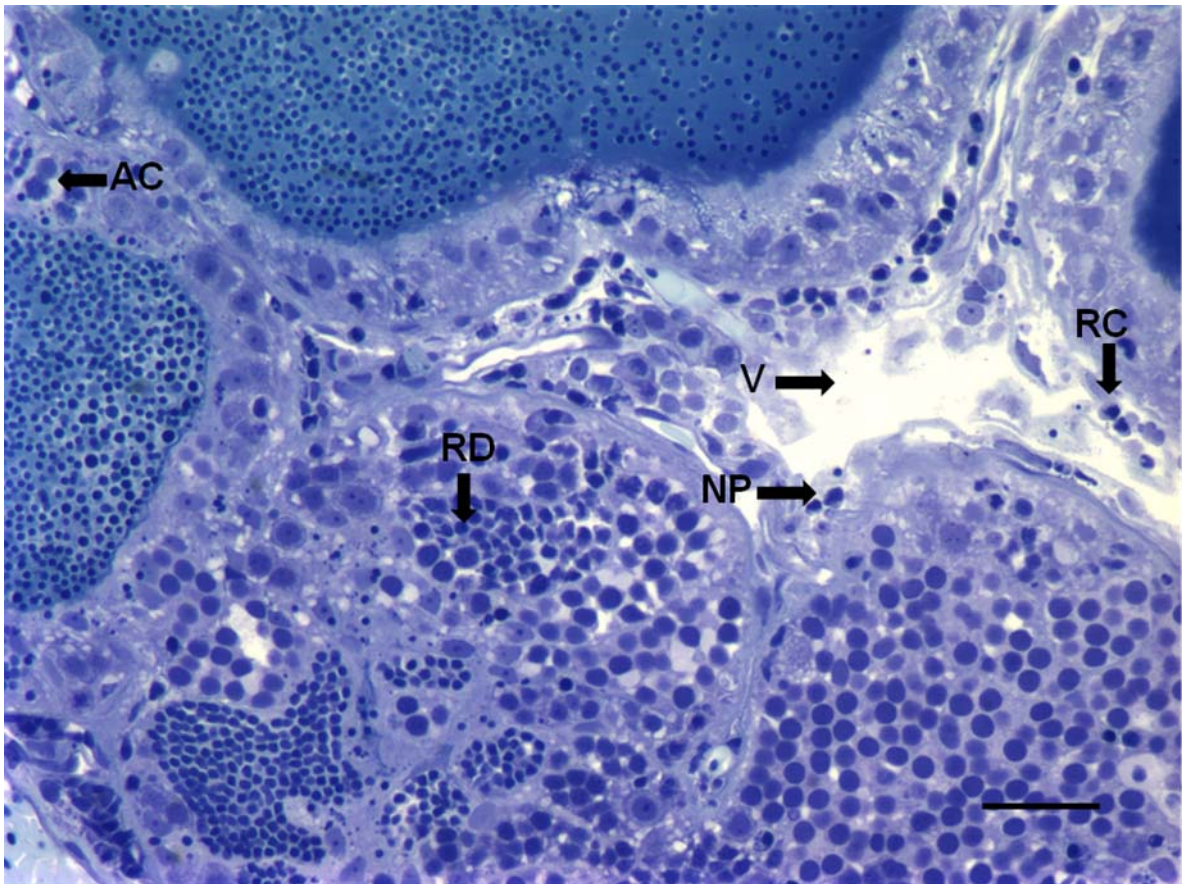


Figura 3. Fotomicrografia da organização estrutural testicular de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 5 mg/L de zinco na água.

RC = ruptura de cisto; RD = retardo no desenvolvimento; NP = núcleo picnótico; AC = aglomerado celular; V = vacuolização. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

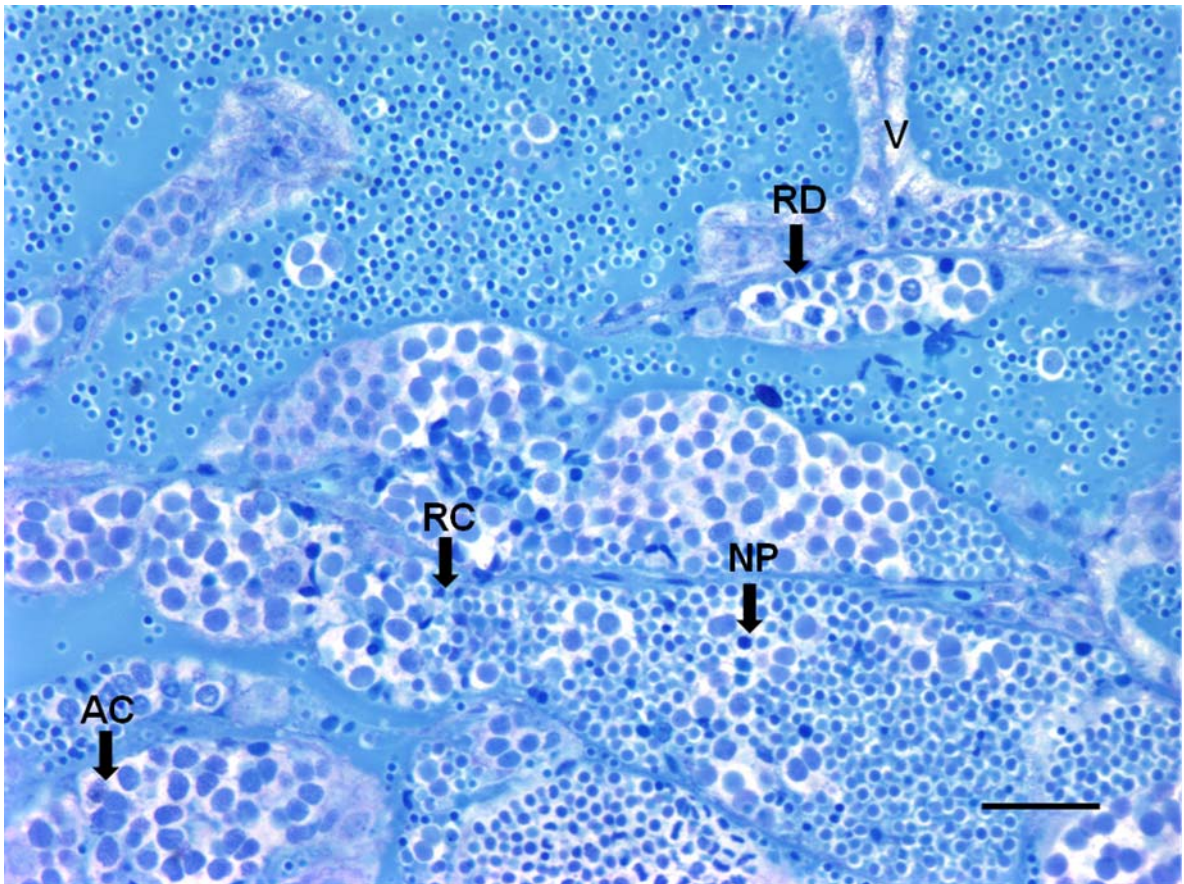


Figura 4. Fotomicrografia da organização estrutural testicular de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 10 mg/L de zinco na água.

RC = ruptura de cisto; RD = retardo no desenvolvimento; NP = núcleo picnótico; AC = aglomerado celular; DPT = descolamento da parede dos cistos; V = vacuolização. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

Houve aumento de células com vacuolizações, que, em estágio mais avançado, podem se tornar células necróticas. Nos peixes que não foram expostos ao zinco, a vacuolização não foi nula, porém, este valor é consideravelmente baixo em relação aos animais que foram expostos, atingindo total vacuolização quando as concentrações foram iguais ou superiores a 10 mg/L de zinco (Tabela 1 e figuras 3, 4, 5, 6, 7). Yamaguchi *et al.*, (2007) estudaram a espermatogênese em “Sutchi catfish” (*Pangasianodon hypophthalmus*), quando expostos a molibdênio, e verificaram que os testículos apresentavam áreas necróticas. Estes resultados também estão de acordo com Manjo & Joris (1995).

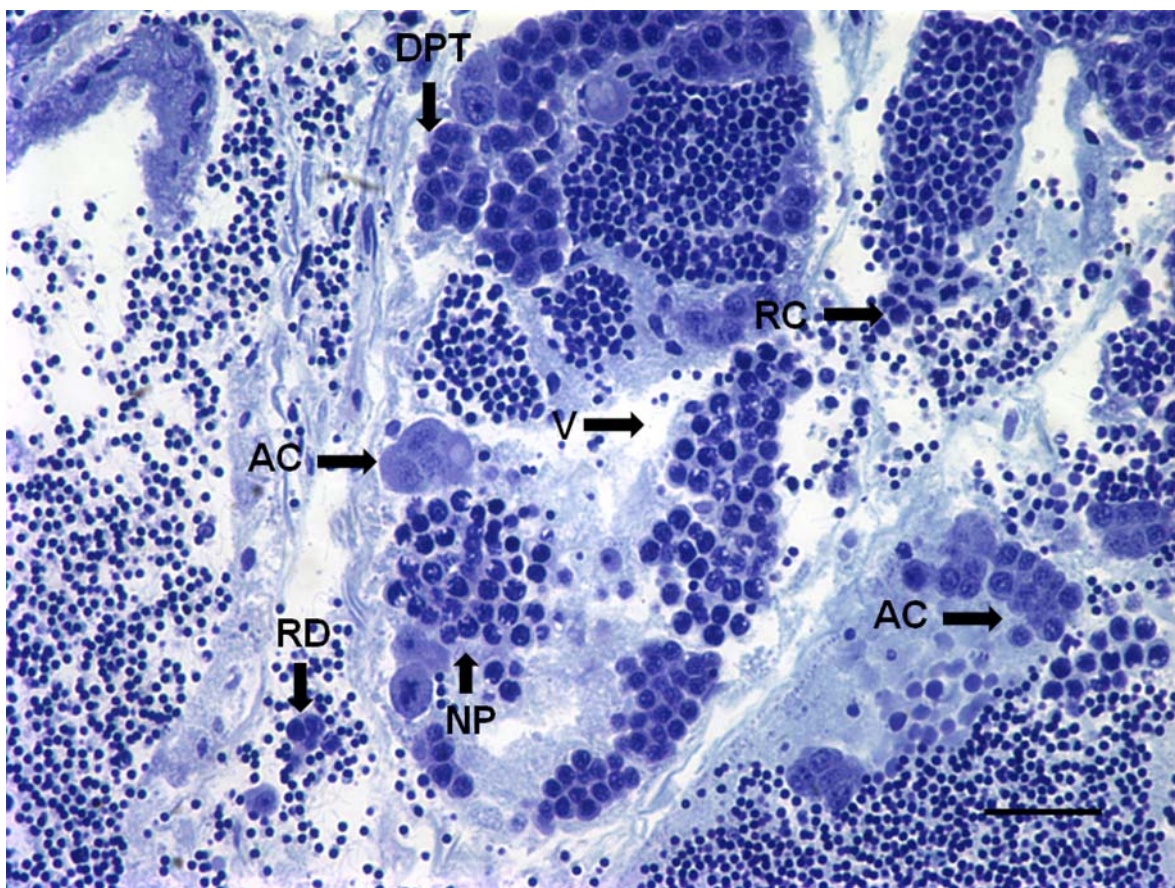


Figura 5. Fotomicrografia da organização estrutural testicular de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 15 mg/L de zinco na água.

RC = Ruptura de cisto; RD = retardo no desenvolvimento; NP = núcleo picnótico; AC = aglomerado celular; DPT = descolamento da parede dos cistos; V = vacuolização. Barra = 30 µm. Coloração Azul de toluidina.

Foi observado que o aumento na concentração de zinco causou a formação de aglomerados de células da linhagem germinativa devido ao comprometimento do processo de divisão celular que não se completou normalmente (Tabela 1 e figuras 3, 4, 5, 6, 7). Substâncias tóxicas parecem atuar indiretamente sobre o equilíbrio entre os hormônios gonadotróficos, vitelogênicos, dopamina e estrogênio, o que se refletirá na diferenciação, maturação, morfologia e fisiologia gonadal (ADAMS, 1990), podendo, entretanto influir diretamente nas divisões celulares do tecido germinativo (BADRE; KUMAR, 1987).

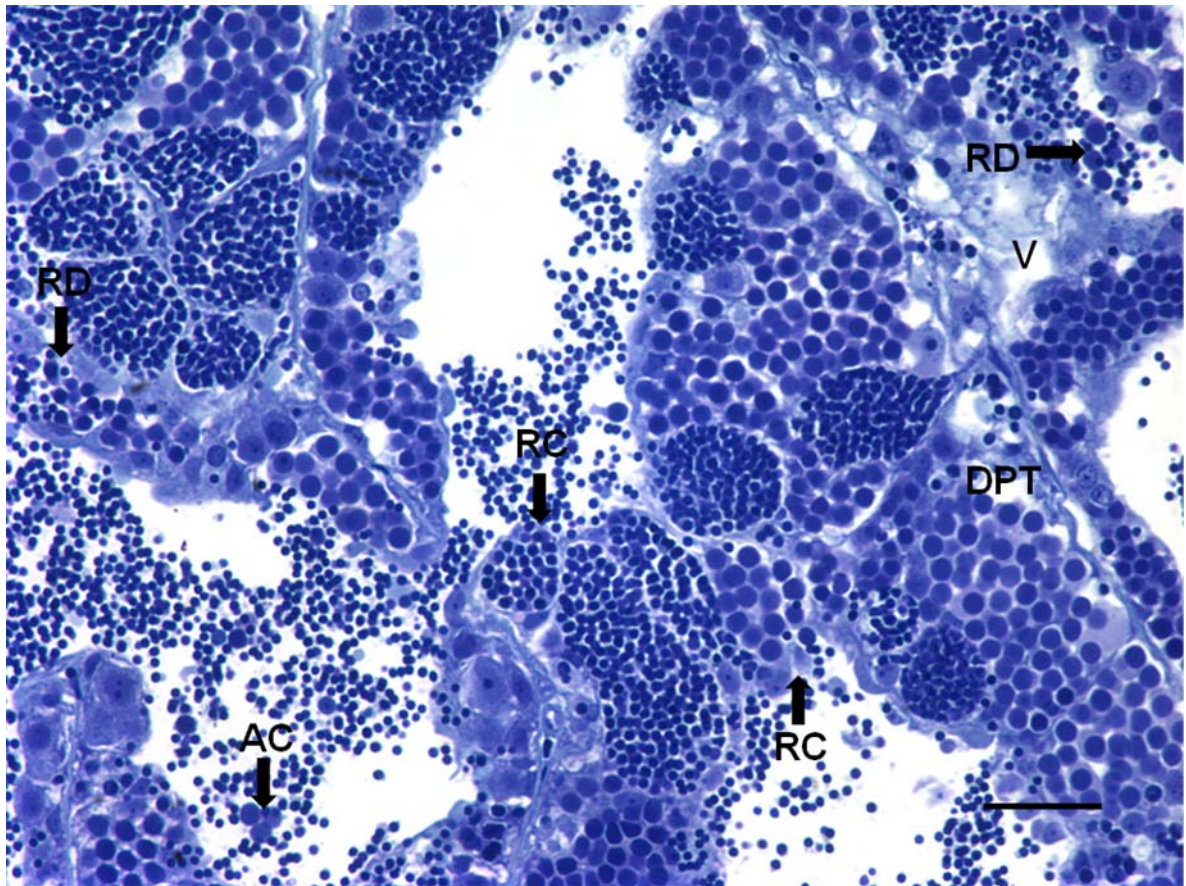


Figura 6. Fotomicrografia da organização estrutural testicular de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 15 mg/L de zinco na água.

RC = ruptura de cisto; RD = retardo no desenvolvimento; NP = núcleo picnótico; AC = aglomerado celular; DPT = descolamento da parede dos cistos; V = vacuolização. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

Houve correlação positiva entre a concentração de zinco e o aumento na ruptura e no deslocamento de cistos causando retração na parede dos túbulos seminíferos, o que não foi verificado em animais do grupo controle (Tabela 1 e figuras 3, 4, 5, 6, 7).

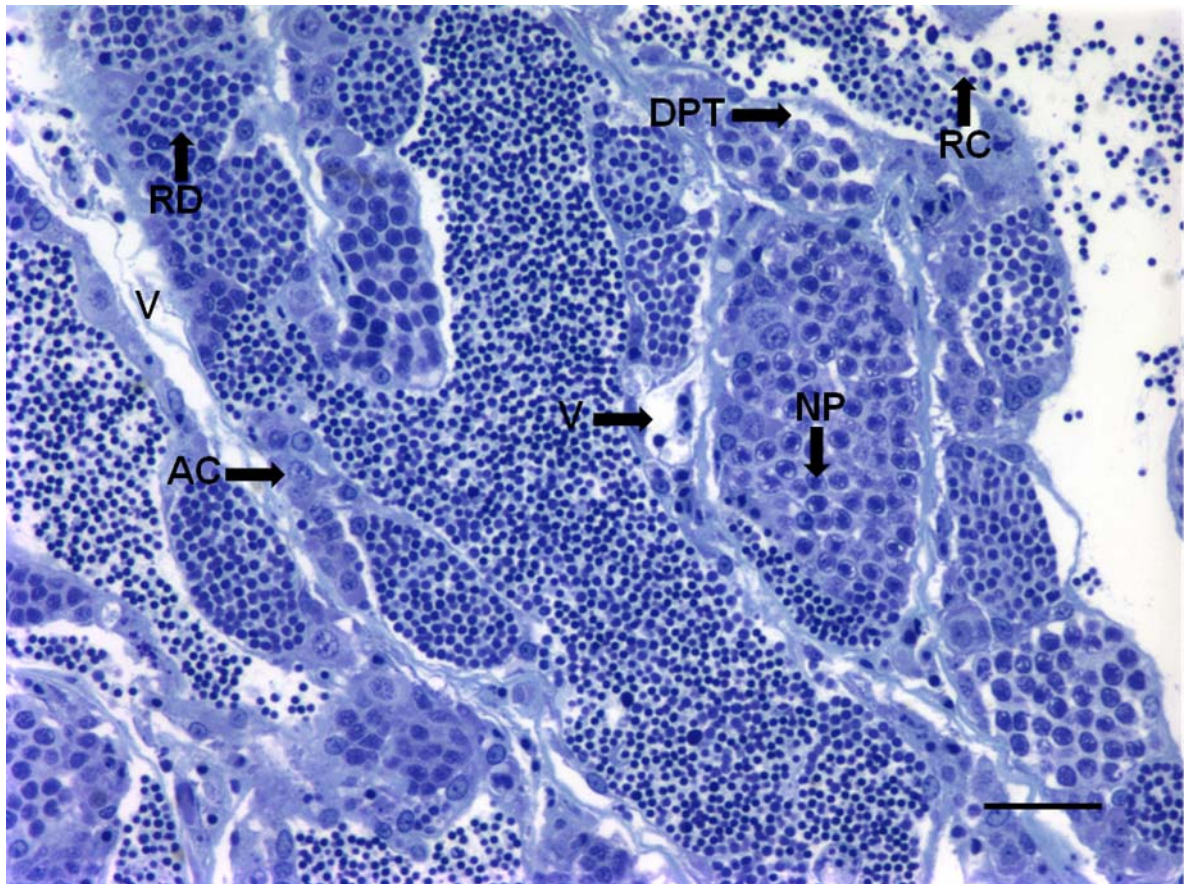


Figura 7. Fotomicrografia da organização estrutural testicular de *A. aff. bimaculatus* expostos a concentrações de 20 mg/L de zinco na água.

RC = ruptura de cisto; RD = retardo no desenvolvimento; NP = núcleo picnótico; AC = aglomerado celular; DPT = descolamento da parede dos cistos; V = vacuolização. Barra = 30 μ m. Coloração Azul de toluidina.

Não houve aumento do número de cistos nas diferentes concentrações de zinco se comparadas ao grupo controle (Tabela 2).

Ocorreu redução na produção de espermatozóide nos grupos submetidos aos tratamentos com 10, 15 e 20 mg/L. Houve, em contrapartida, aumento na produção de líquido tubular nos túbulos seminíferos dos animais tratados com 5, 15 e 20 mg/L (Tabela 2). Os animais do tratamento com 10 mg/L não apresentaram aumento significativo do líquido tubular porque o número de cistos componentes do túbulo causaram aumento da espessura da parede e conseqüente redução do lúmen tubular. Este resultado pode ser explicado devido à toxicidade do zinco que possivelmente provocou a apoptose

das células da linhagem germinativa, diminuindo dessa forma, a quantidade de espermatozóides viáveis.

Não houve diferença estatística na proporção de túbulo e intertúbulo (Tabela 2).

Tabela 1: Percentual de alterações histopatológicas em testículos de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de zinco.

Concentração de zinco (mg/L)	Histopatologias testicular (%)					
	RC	RD	NP	AC	DPC	V
0	16,7	0,0	8,3	8,3	0,0	8,3
3	83,3	83,3	91,7	66,7	8,3	33,3
5	91,7	100,0	100,0	100,0	25,0	50,0
10	100,0	100,0	100,0	100,0	58,3	100,0
15	100,0	100,0	100,0	100,0	83,3	100,0
20	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Legenda: RC = ruptura de cisto; RD = retardo no desenvolvimento; NP = núcleo picnótico; AC = aglomerado celular; DPT = descolamento da parede dos cistos; V = vacuolização.

Tabela 2: Percentual da constituição testicular de machos de *A. aff. bimaculatus* submetidos a tratamentos com diferentes concentrações de zinco.

Concentrações de zinco (mg/L)	Constituição testicular (%)				
	Cisto	Lúmen		Intertúbulo	Túbulo
		Esper.	L. tubular		
0	46,52 ab	34,14 c	12,82 a	6,52 a	93,48 a
3	46,25 ab	30,36 bc	18,98 ab	4,41 a	95,59 a
5	37,05 a	33,45 c	25,64 b	3,86 a	96,14 a
10	54,84 b	18,85 ab	21,94 ab	4,37 a	95,63 a
15	48,53 ab	19,18 ab	27,23 b	5,06 a	94,94 a
20	51,31 ab	13,39 a	28,77 b	6,53 a	93,47 a
CV (%)	29.25	43.52	37.59	52.67	2.85

Legenda: Esper.= espermatozóide; L. tubular = Líquido tubular.

A Resolução CONAMA nº 357 de 17/03/2005, estabelece o valor máximo de 5 mg/L de Zn^{2+} para água própria para a criação de animais (CONAMA, 2005). No entanto, de acordo com este estudo, essa concentração de zinco na água comprometeu as funções reprodutivas da espécie havendo, portanto, a necessidade de revisão desta legislação brasileira. O retardo do desenvolvimento dos cistos levou à redução na produção de espermatozoides, podendo comprometer a taxa de fecundidade e conseqüentemente na manutenção dos estoques populacionais.

CONCLUSÕES

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

A exposição de *A. aff. bimaculatus* ao zinco provocou alterações histopatológicas aos testículos, sendo essas patologias correlacionadas positivamente com o aumento da concentração em que os peixes foram expostos, comprometendo sua função reprodutiva, pois houve redução da produção de espermatozoides.

Pôde-se estimar a CL50/96 horas na exposição aguda para *A. aff. bimaculatus* como sendo de aproximadamente 10 mg/L de zinco.

Houve maior acúmulo de zinco nos tecidos ósseos seguido dos testículos. A musculatura não apresentou acúmulo significativo.

O *A. aff. bimaculatus* mostrou-se uma espécie sensível mesmo quando expostos a baixas concentrações de zinco na água, e, portanto, é adequado como bioindicador.

O testículo por ser um órgão importante na manutenção dos estoques populacionais, e bastante sensível ao zinco, pode ser considerado como bioindicador.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, S. M., **Biological indicators of stress in fish**. American Fisheries Society Symposium 8, 1990, 190p.

BADRE, A.A.; KUMAR, K. Malathion toxicity: effect on the ovary of zebra fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae). **Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie**, v.72, n.4, p.517-528, 1987.

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

BILLARD, R.; BRETON, B.; FOSTIER, A.; JALABERT, B.; WEIL, C. Endocrine control of the teleost reproductive cycle and its relation to external factors: salmonid and cyprinid models. In: GAILLARD, P.J.; BOER, H.H. (eds.). **Comparative Endocrinology**. Amsterdam: Elsevier, p.37-48, 1978.

CELIK, U.; OEHLenschLAGER, J. Determination of zinc and copper in fish samples collected from Northeast Atlantic by DPSAV. **Food Chemistry**, v.87, p.343-347, 2004.

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

DE LA TORRE, F.R.; FERRARI, L.; SALIBIÁN, A. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. **Chemosphere.**, v.59, n.4, p.577-583. 2005.

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

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**, v.125, p.355-360, 2003.

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

GRIER, H.J. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (eds.). **The Sertoli Cell**. Clearwater: Cache River Press. 1993, p.703-739.

GUERESCHI, R.M. **Macroinvertebrados bentônicos em córregos da Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP: subsídios para monitoramento ambiental**. 2004, 82p. São Carlos. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de São Carlos, 2004.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Virginia: Lewis Publishers, 1995, 359p.

HINTON, D.E.; LAURÉN, D.J. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. In: ADAMS, S.M. (Ed) **Biological indicators of stress in fish**. Bethesda: American Fisheries Society Symposium 8, 1990. p.51-66.

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

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

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

KENNISH, M.J. **Ecology of estuaries: anthropogenic effects**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.

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

KUBITZA, F. **Qualidade da água na produção de peixes**. 3. ed. Jundiaí: F. Kubitza. 97p., 1999.

LE GAC, F.; LOIR, M. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (ed.). **Encyclopedia of Reproduction**. San Diego: Academic Press, 1999, v.3, p.20-30.

MANJO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v.146, p.3–15, 1995.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) **A bacia do rio Tibagi**. Londrina: 2002. Cap. 29, p.551 – 577.

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

MONTOYA, L.N.F. **Efeitos do thiodan® sobre a morfologia do testículo de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sexualmente imatura**. 2008. 77p. Viçosa, MG. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2008.

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

NIGRO, M.; FALLENI, A.; DEL BARGA, I.; SCARCELLI, V.; LUCCHESI, P.; REGOLI, F.; FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. **Aquatic Toxicology**. v.77, n.4, p.339-347, 2006.

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

OYAKAWA, T.O.; AKAMA, A.; MAUTARI, K.C.; NOLASCO, J.C. **Peixes de Riachos da Mata Atlântica nas Unidades de Conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo**. São Paulo: Ed. Neotrópica, 2006, 201p.

PAPAGIANNIS, I.; KAGALOU, I.; LEONARDOS, J.; PETRIDIS, D.; KALFAKAKOU, V. Copper and zinc in four freshwater fish species from Lake Pamvotis (Greece). **Environment International**, v.30, p.357-362, 2004.

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*. v.5, p.457-470, 2007.

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy research and technique**. v.6, p.459-497, 1995.

RADTKE, R. The mummichog: a fish for all reasons. **Sea Frontiers**, v.5, p. 145-149, 1979.

RAINBOW, P.S.; DALLINGER, R. Metal uptake, elimination and regulation in freshwater invertebrates. In: DALLINGER, R.; RAINBOW, P.S. (eds.). **Ecotoxicology of metals in invertebrates**. Lewis Publishers, Boca Raton, USA, 1993, p.119-131.

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

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

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

SCHULZ, R.W.; MENTING, S.; BOGERD, J.; FRANCA, L.R.; VILELA DA, GODINHO, H.P. Sertoli cell proliferation in the adult testis - evidence from two fish species belonging to different orders. **Biology of Reproduction**. v.73, n.5, p.891-898, 2005.

SILVA, M. **Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemotesticular da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus***. 1987. 164p. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1987.

SILVA, M.; GODINHO, H. P. Timing of some events of the gametogenesis in the male Nile tilapia, *Sarotherodon niloticus*. **Archives of Anatomy and Microscopy**, v.72, p.231-237, 1983.

VALDEZ DOMINGOS, F.X. **Biomarcadores de contaminação ambiental em peixes e ostras de três estuários brasileiros e cinética de derivados solúveis do petróleo em peixes**. 2006. 130p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

VIARENGO, A. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. **Reviews in Aquatic Sciences**. v.1, p.295. 1989.

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 - part A: Molecular & Integrative Physiology*, v.137, n.3, p.447-477, 2004.

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**, v.83, p.43-51, 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos indicam o alto índice de toxicidade do zinco para *A. aff. bimaculatus*. Os tecidos branquiais e hepáticos demonstraram ser um excelente indicador de contaminação para zinco na espécie estudada. Adicionalmente, os testículos apresentaram-se como órgãos bastante sensíveis à contaminação, e dessa forma, podem ser utilizados como bioindicadores.

Há necessidade de revisão da resolução do CONAMA n° 357 de 17/03/2005, que estabelece o valor máximo de 5 mg/L de Zn^{2+} para água própria para a criação de animais e também para consumo humano, devido ao grande número de patologias identificadas nos órgãos estudados, considerados vitais para os peixes.

A avaliação da concentração de zinco nos tecidos dos peixes permite inferir a quantidade consumida desse metal na alimentação humana, devido ao processo de biomagnificação. Por este trabalho ser inovador com relação à utilização de espécie brasileira comum e bastante consumida, é necessário que haja mais pesquisas e que estas sejam detalhadas no sentido de avaliar os efeitos na saúde humana.

ANEXOS

Anexo 1:

Tabela 1: Concentração de zinco (mg/L) na água dos aquários durante o período experimental.

Concentração de zinco (mg/L)	Tempo (horas)				
	0	24	48	72	96
0	0,1740	0,2036	0,2035	0,2158	0,2222
3	2,5752	2,0859	1,9065	1,7790	1,7823
5	4,4990	4,1580	3,9645	3,7755	3,7035
10	8,9960	9,2010	8,3590	8,1200	8,2250
15	14,8230	14,9775	13,1535	13,1385	13,3065
20	17,8860	17,8740	-	-	-

Anexo 2:

Tabela 2: Oxigênio dissolvido (O₂ – mg/L), dureza total (DT - mg/L de CaCO₃), amônia tóxica (AT - mg/dm³), pH e condutividade elétrica (CE- mS/cm) na água dos aquários durante o período experimental de exposição de *A. aff. bimaculatus* a diferentes concentrações de zinco.

Concentração de zinco (mg/L)	Características	Tempo (horas)				
		0	24	48	72	96
0	O ₂	11,0	8,0	8,0	6,0	4,0
	DT	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	AT	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009
	pH	6,8	7,0	7,2	7,4	7,5
	CE	0,06	0,06	0,07	0,07	0,07
3	O ₂	8,0	8,0	6,0	6,0	6,0
	DT	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	AT	0,001	0,002	0,003	0,006	0,009
	pH	6,7	6,8	7,0	7,5	7,4
	CE	0,07	0,07	0,07	0,07	0,08
5	O ₂	8,0	8,0	6,0	6,0	4,0
	DT	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	AT	0,001	0,002	0,002	0,004	0,009
	pH	6,7	6,7	6,8	7,2	7,2
	CE	0,08	0,09	0,09	0,09	0,10
10	O ₂	6,0	8,0	6,0	4,0	6,0
	DT	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	AT	0,001	0,001	0,001	0,003	0,007
	pH	6,7	6,6	6,5	7,1	7,0
	CE	0,10	0,11	0,11	0,11	0,11
15	O ₂	6,0	8,0	6,0	4,0	6,0
	DT	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
	AT	0,001	0,001	0,001	0,005	0,006
	pH	6,8	6,5	6,5	6,9	6,9
	CE	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
20	O ₂	6,0	8,0	-	-	-
	DT	50,0	50,0	-	-	-
	AT	0,001	0,001	-	-	-
	pH	6,8	6,3	-	-	-
	CE	0,12	0,14	-	-	-

Anexo 3:

Tabela 2: Percentual da mortalidade de *A. aff. bimaculatus* durante o tempo de exposição a diferentes concentrações de zinco. n = 12

Concentração de zinco (mg/L)	Mortalidade (%)				
	24h	48h	72h	96h	Total
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	50,0	0,0	0,0	0,0	50,0
15	66,6	0,0	8,33	0,0	75,0
20	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0