


---

Ciências Biológicas Integral

---

**Ana Claudia de Castro Marcato**

**Análise morfológica de brânquias de peixes  
*Oreochromis niloticus* (tilápia) expostos ao níquel**



Rio Claro  
2011

Ana Claudia de Castro Marcato

Análise morfológica de brânquias de peixes *Oreochromis niloticus* (tilápia)  
expostos ao níquel

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Bociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de Bacharel e Licenciado em Ciências  
Biológicas.

Rio Claro  
2011

574.5263 Marcato, Ana Claudia de Castro  
M313a Análise morfológica de brânquias de peixes *Oreochromis niloticus* (tilápia) expostos ao níquel / Ana Claudia de Castro Marcato. - Rio Claro : [s.n.], 2011  
35 f. : il., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas Integral) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro  
Orientador: Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

1. Ecologia aquática. 2. Ecotoxicologia aquática. 3. Bioindicador. 4. Histologia. 5. Histoquímica. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
que sempre me apoiaram e me incentivaram  
a correr atrás dos meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha família, que me incentivou a seguir meu sonho, que me ensinou a ser tudo aquilo que sou; mostrou-me as coisas em que devo acreditar e que me ensinou a ter Fé. Fé em Deus, fé nas pessoas, fé nas atitudes e ações e fé no mundo.

Quero agradecer aos amigos que fiz durante esses 5 anos de CBI 2007, cada um foi importante do seu jeito para que eu pudesse crescer e amadurecer durante este tempo.

Agradeço também, e aproveito para pedir desculpas, aos bixos que “sofreram” na minha companhia. Vocês também foram importantes para que isso terminasse, e muito mais importante para que eu me divertisse durante esses anos. E aproveito aqui para agradecer em geral TODOS os meus veteranos, vocês me criaram assim, então não reclamem!

Em especial, agradeço à Marília (Pedrita), Tainá (Ricota), Clara, Tatiana (Larva), Ana Carolina (Bauru), Rafael (Mão), Thiago (Reto), Thays (Miss) pelas risadas, pelos choros, pela companhia nas noites de estudo, pelas camas emprestadas, pelas aventuras nas viagens de férias, pelos almoços, cafés da tarde e jantas, pelas tarde e noites passadas no Sujinhos, pelas ressacas, pelas festas, pela amizade que pretendo conservar pro resto da minha vida.

Agradeço também aos amigos das Repúblicas Safari, Várzea, Computaria e, especialmente, a 51, pelas canas nos momentos alegres, nos momentos tristes, nos momentos de “zueira”, nos momentos de “salsichada”, de “torar o pau” e enfim... por serem a família que eu escolhi fora da biologia.

Agradeço ao Cícero (Ema), por ter sido o melhor cheiro que eu poderia encontrar nesta Universidade, afinal, sem ele essa amizade não teria começado. Obrigada pelos 5 anos de companhia, filmes, bisnaguinhas, requeijão e cappuccino.

Gostaria de agradecer todos os meus amigos de estágio, por me ensinarem o quão divertido pode ser o trabalho. Obrigada à Jana, Cintya, Tamaris, Raphael (Bairral), Larissa, Guilherme, Vlamir, Annelise, Amanda (Vandinha), Júlia, Jorge (Noé), Vanessa, Cristina (Mini), Vinicius e Isabela.

Agradeço os técnicos pela paciência e compreensão nos momentos de trabalho e pela diversão nos momentos de lazer, Gerson, Monika, Antônio e Sandra.

Agradeço a Tamaris, o Edson e o Samuel por me aguentarem diariamente em sua casa e em suas vidas. Obrigada pela amizade e pelos ensinamentos diários, tanto profissionais como pessoais.

Por fim, agradeço a Carmem, minha orientadora, que me aceitou como sua orientada e que me ensinou muito mais que o profissional. Obrigada pela amizade, pela dedicação, pelas broncas e pelo carinho.

Se não for hoje, um dia será.  
Algumas coisas, por mais impossíveis e malucas que pareçam,  
a gente sabe, bem no fundo, que foram feitas pra um dia dar certo.  
- Caio Fernando Abreu

## RESUMO

A água é um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais dos seres vivos. Tem-se observado um crescente comprometimento da qualidade deste recurso, devido à poluição de muitos mananciais e até de bacias hidrográficas inteiras, seja por resíduos industriais, esgoto doméstico, ou ainda, por substâncias utilizadas na agropecuária, tais como pesticidas, herbicidas e fertilizantes. O níquel é o 24º elemento mais abundante na Terra; é um metal pesado que, na forma de cloreto é comprovadamente genotóxico e mutagênico. Devido a sua utilização industrial, houve considerável aumento da sua concentração em sedimentos superficiais. Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial de perigo de substâncias químicas ou a possibilidade da poluição ambiental. Devido ao comprometimento da qualidade da água e aos poucos trabalhos publicados relacionando o níquel com a alteração tecidual, este estudo teve por objetivo verificar as consequências da presença de níquel no ambiente aquático. Para esta análise foram utilizados indivíduos de *Oreochromis niloticus*, expostos por 96 horas à três diferentes concentrações de níquel dissolvidos na água, sendo uma a permitida pela legislação brasileira, de acordo com a resolução CONAMA, uma concentração abaixo e o dobro da concentração permitida, comparadas a um grupo controle. Após a exposição, foram retiradas as brânquias e, estas foram analisadas por meio de análises ultramorfológica, histológica e histoquímicas. Os resultados obtidos indicam que todas as concentrações utilizadas no experimento alteraram a histofisiologia dos indivíduos expostos. Foram observadas as seguintes alterações: ruptura das células pavimentosas, decorrendo em hemorragia, perda das cristas superficiais destas células e desprendimento epitelial nas brânquias de todos os animais, em todos os tratamentos com cloreto de níquel; a análise histoquímica demonstrou a não proliferação de células clorídricas, entretanto, observou-se um aumento dose-dependente de células mucosas, em todos os animais. Portanto, o níquel apresenta potencial tóxico aos peixes, desde a menor concentração utilizada até o dobro da permitida pela legislação, indicando que a resolução CONAMA deveria ser revista e reavaliada para este parâmetro.

## **ABSTRACT**

Water is an essential factor in maintaining the vital functions of living beings. We have observed a growing commitment of quality, are due to pollution from many sources and even entire watersheds, whether for industrial waste, sewage, or for substances used in farming such as pesticides, herbicides and fertilizers. Nickel is the 24th most abundant element on earth, is a heavy metal that, in the form of chloride, is a proven genotoxic and mutagenic. Due to its industrial use, there was considerable increase of its concentration in surface sediments. Fish combine characteristics that make them excellent experimental models for aquatic toxicology studies, which are particularly usable as warn about the potential danger of chemicals or the possibility of environmental pollution. Due to impaired water quality and the few published studies relating the nickel with the tissue change, this study aimed at assessing the consequences of the presence of nickel in the aquatic environment. For this analysis, we used individuals of *Oreochromis niloticus*, exposed for 96 hours at three different concentrations of nickel dissolved in water compared to a control group. After exposure, the gills were removed and these were analyzed by ultramorphological, histological and histochemical analysis. The results indicate that all concentrations used in the experiment altered the histophysiology of exposed individuals. We observed the following changes: rupture of pavement cells, thus resulting in bleeding, loss of microridges surface of these cells and epithelial loss in the gills of all animals in all treatments with nickel chloride, the histochemical analysis showed non-proliferation of chloride cells. However, there was a dose-dependent increase of mucus cells in all animals. Therefore, nickel has toxic potential to fish, from the smallest concentration used up to twice as permitted by law, indicating that the CONAMA resolution should be reviewed and reassessed for this parameter.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Água.....	6
2.2 O níquel.....	7
2.3 Peixes como bioindicadores.....	8
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1 Material biológico.....	11
4.2 Níquel.....	11
4.3 Bioensaio.....	12
4.4 Histologia.....	12
4.4.1 Coloração convencional.....	12
4.4.2 Histoquímica.....	13
4.4.2.1 Polissacarídeos neutros – Técnica de Ácido Periódico-Schiff (PAS).....	13
4.4.2.2 Cálcio – Método de von Kossa.....	13
4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	13
4.6 Análise e documentação dos resultados.....	13
5. RESULTADOS.....	14
5.1 Ultramorfologia.....	14
5.2 Histologia.....	14
5.3 Histoquímica.....	15
6. DISCUSSÃO.....	16
7. CONCLUSÃO.....	18
8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	19

## 1. INTRODUÇÃO

A contaminação aquática por compostos de origem antropogênica, principalmente metais pesados, tem preocupado a comunidade científica mundial. Nesse sentido, por sua ampla utilização na indústria, o níquel (Ni) é um metal pesado, lançado constantemente no ambiente, principalmente pelos processos de galvanoplastia, fabricação de aço inoxidável, manufatura de baterias, pigmentos, dentre outros. A exposição dos organismos a este metal tem consequências prejudiciais, como foram destacados nos trabalhos de Roekens (1988), Marques (1993), Yokoi et al. (2003), Kazprzak et al. (2003), Doreswamy et al. (2004), Deleebeeck (2007), Klein e Costa (2007) e Rana (2008).

Estudos de biomonitoramento ambiental, com diferentes organismos teste, tem sido cada vez mais requeridos para avaliar o real impacto de uma substância (ou composto) sobre a saúde dos organismos, uma vez que as análises químicas apenas detectam a presença e quantidade desta. Em avaliações da ecotoxicologia aquática, diversas espécies de invertebrados e peixes têm sido empregadas (DAVID; FONTANETTI, 2005; MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; DAVID et al., 2008; HOSHINA et al., 2008; BIAGINI et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2009).

O peixe da espécie *Oreochromis niloticus* é muito importante por sua ampla comercialização na região sudeste do Brasil, particularmente em São Paulo (ALVES-COSTA, 2001); é também uma espécie comumente encontrada em estuários de todo o mundo, respondendo rapidamente às alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996).

As brânquias dos peixes são o principal alvo de vários poluentes aquáticos (KIKUCHI et al., 1978), sendo seu epitélio, um excelente modelo para examinar os efeitos de substâncias dissolvidas nos tecidos (EVANS, 1987); além disso, as brânquias são os órgãos mais afetados por seu contato constante com a água (MISHRA et al., 1985), por isso, são geralmente considerados bons indicadores da qualidade da água (RANKIN et al., 1982) e os peixes, modelos para estudo de impacto ambiental (MALLAT, 1985; EVANS, 1987; LAURENT; PERRY, 1991; MCKIM; ERICKSON, 1991; WENDERLAAR BONGA; LOCK, 1992).

As alterações histológicas observadas nas brânquias dos peixes são reconhecidas como um método rápido e válido para determinar os danos causados por exposição a diferentes poluentes nos peixes (ARELLANO et al., 1999). Como a brânquia é o principal local de troca gasosa e de função importante na regulação iônica, as alterações morfológicas causadas pela exposição aos poluentes resultam em distúrbios respiratórios (CERQUEIRA;

FERNANDES, 2002). Perry e Laurent (1993) consideram que as alterações morfológicas das brânquias, ocorrem durante as mudanças ambientais, como forma adaptativa de tentar conservar algumas das suas funções fisiológicas.

Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo geral verificar os efeitos da presença de níquel no ambiente aquático, por meio de análises ultramorfológica, histológica e histoquímica das brânquias de tilápias expostas a três diferentes concentrações de cloreto de níquel.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A água**

A água é um dos fatores essenciais para a manutenção das funções vitais dos seres vivos. Com o contínuo crescimento populacional e um conseqüente aumento no consumo da água, o uso racional desse bem mineral tem sido incentivado, visando uma conservação da qualidade de nossas águas, já que se trata de um recurso mineral finito.

Atualmente, vem sendo observado um crescente comprometimento da qualidade da água, devido à poluição de muitos mananciais e até de bacias hidrográficas inteiras, seja por resíduos industriais, esgoto doméstico, ou ainda, por substâncias utilizadas na agropecuária, tais como pesticidas, herbicidas e fertilizantes.

A contaminação aquática por dejetos industriais e domésticos é hoje, uma grande preocupação da saúde pública (MARIA et al., 2003), uma vez que o consumo de água contaminada, direto ou indireto, pode causar sérios danos aos organismos. Acredita-se que 80% de todas as moléstias, e mais de um terço dos óbitos dos países em desenvolvimento, sejam causados pelo consumo de água contaminada e que, até um décimo do tempo produtivo de cada pessoa é perdido devido às doenças relacionadas com a água. São os esgotos e excrementos humanos, os principais responsáveis pela deterioração da qualidade da água em países em desenvolvimento.

A contaminação ambiental por metais pesados tem aumentado significativamente nas últimas décadas, principalmente com o desenvolvimento da indústria moderna (STEINKELLNER et al., 1998). De acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB (2006), os metais pesados surgem nas águas naturais devido aos lançamentos de efluentes industriais tais como os gerados em indústrias extrativistas de metais, indústrias de tinta e pigmentos e, especialmente, às de galvanoplastia, que se espalham em grande número nas periferias das grandes cidades. Além destas, os metais pesados podem

ainda estar presentes em efluentes de indústrias químicas, como as de formulação de compostos orgânicos, indústria de couro, pele e produtos similares, indústrias de ferro e aço, lavanderias e indústrias de petróleo.

A importância da preservação dos recursos hídricos tem levado a necessidade de monitorar e controlar a contaminação desses ambientes, uma vez que os metais pesados estão entre os contaminantes mais tóxicos e persistentes; logo, suas fontes, transporte, destino e efeitos precisam ser avaliados (CAMPOS et al., 2002).

## 2.2 O níquel

O níquel (Ni) é um metal pesado com peso atômico de 58,71. Os seus componentes de interesse incluem óxido de níquel (NiO), hidróxido de níquel (Ni(OH)<sub>2</sub>), sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) e cloreto de níquel (NiCl<sub>2</sub>). Os sais de níquel de ácidos orgânicos fortes são solúveis em água, enquanto os sais de níquel de ácidos inorgânicos fracos são insolúveis. O níquel é resistente à corrosão pelo ar, água e por agentes alcalinos (VILAPLANA et al., 1991).

O níquel existe como um elemento natural na crosta terrestre e é o 24º elemento mais abundante. As fontes mais importantes de níquel são os minérios na forma de sulfeto de níquel. Os maiores depósitos de minério de níquel estão no Canadá, Sibéria e Nova Caledônia, território francês no Pacífico Sul (KLEIN; COSTA, 2007).

O principal uso do níquel é na produção de ligas, na indústria de galvanoplastia, fabricação de baterias (baterias de Ni-Cd), produtos de petróleo, pigmentos, catalisadores (MOORE; RAMAMOORTHY 1984), fabricação de componentes eletrônicos, utensílios de cozinha, instrumentos dentários e próteses circulatórias (KLEIN; COSTA, 2007).

A queima de combustíveis fósseis e a poluição de níquel pelas indústrias são as fontes primárias de exposição do ambiente ao níquel. Mais especificamente, as fontes emissoras de níquel para a atmosfera incluem a combustão de carvão e petróleo, a incineração de resíduos e lamas de depuração, mineração e produção de aço e galvanoplastia (WHO, 1991). Estima-se que aproximadamente 180.000 toneladas de níquel por ano são geradas pela queima de combustíveis fósseis e processos industriais (IARC, 1990).

Durante este século, a média das concentrações de níquel em sedimentos superficiais aumentou cerca de 25 vezes. Metais, incluindo níquel, provocam a contaminação dos solos em áreas urbanas devido à atividade industrial do passado e o uso de combustíveis fósseis; porém a avaliação de riscos com modelos, não prevêem riscos para a saúde pela reutilização de tais solos para o cultivo de culturas alimentares (KLEIN; COSTA, 2007).

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC, 1990) os componentes do níquel são carcinogênicos para os seres humanos, visto que as partículas de níquel insolúveis são as mais carcinogênicas segundo a maioria dos experimentos em animais *in vivo* e dados de genética toxicológica *in vitro*. Entretanto, os dados mais recentes de epidemiologia humana e experimental sugerem que os compostos de níquel solúveis podem representar um risco igual.

Dados da genética toxicológica e molecular mostram que o cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) pode, de fato, ser genotóxico e mutagênico, especialmente quando as células são expostas por longos períodos (KLEIN; COSTA, 2007).

O níquel é tóxico para o sistema reprodutivo, causando espermiogênese aberrante e deformação do útero de animais expostos. Em camundongos, uma dieta de níquel de 1mg/Kg pode danificar os espermatozóides, reduzindo a sua mobilidade normal, alterando funções fisiológicas (YOKOI et al., 2003), provavelmente, por sua capacidade de causar danos oxidativos (DORESWAMY et al., 2004; KAZPRZAK et al., 2003). Segundo Hauptman et al. (1993), o cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2$ ) pode induzir lesões oculares e má formação da retina em embriões de *Xenopus*.

A toxicidade do níquel na vida aquática varia amplamente e é influenciada por fatores como pH, oxigênio dissolvido, dentre outros fatores. Na água, o metal é tóxico para plantas em concentrações de aproximadamente  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; afeta a reprodução de crustáceos na água doce, quando atinge cerca de  $95 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Em concentrações de  $300 \mu\text{g.L}^{-1}$  pode matar larvas de moluscos marinhos e acima de  $730 \mu\text{g.L}^{-1}$  é prejudicial à reprodução de pequenos peixes de água doce (ROEKENS, 1988; MARQUES; CHIERICE, 1993).

No Brasil, não existe padrão de potabilidade para o níquel, na Portaria 518/04, sendo utilizado como referência pelo CONAMA, o estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que tem o valor máximo permitido de 0,025 mg/L.

### 2.3 Peixes como bioindicadores

Para análise das condições ambientais muitos organismos-teste vêm sendo utilizados, tais como cebola (MARIN-MORALES, 2004; MATSUMOTO et al., 2006; CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008; LEME; MARIN-MORALES 2008; HOSHINA; MARIN-MORALES, 2009, MATSUMOTO; SOUZA et al., 2009), peixes (MATSUMOTO et al., 2006; SOUZA; FONTANETTI, 2006; HOSHINA et al., 2008; BIAGINI et al., 2009; CHRISTOFOLETTI et al., 2009), moluscos (DAVID; FONTANETTI, 2005; DAVID et al., 2008), dentre outros.

Os peixes reúnem características que os tornam excelentes modelos experimentais para estudos de toxicologia aquática, em que são particularmente utilizáveis, pois alertam sobre o potencial perigo de substâncias químicas ou para a possibilidade da poluição ambiental (POWERS, 1989). Além disso, os peixes acumulam substâncias químicas por exposição direta aos químicos presentes nas águas dos rios e mares, ou através da cadeia alimentar do ecossistema de maneira indireta (ATEEQ et al., 2002).

De acordo com Harshbarger e Clarck (1990), os peixes constituem bons organismos-teste para o monitoramento da qualidade da água, especialmente espécies pequenas de aquário, pois podem ser mantidos em laboratório e são facilmente expostos à substâncias tóxicas de maneira similar a outros vertebrados superiores, podendo ser usados para a avaliação da presença de substâncias que tenham o potencial de causar efeitos teratogênicos e carcinogênicos em humanos.

Segundo Alves-Costa (2001), as espécies *O. niloticus* e *Hoplias malabariscus* são excelentes sistemas-teste para ensaios laboratoriais realizados para a investigação da toxicidade de substâncias contaminantes em ecossistemas aquáticos.

As brânquias dos peixes são o alvo principal para vários poluentes aquáticos em geral (KIKUCHI et al., 1978), sendo seu epitélio, um excelente modelo para examinar os efeitos de substâncias dissolvidas nos tecidos (EVANS, 1987); além disso, as brânquias são os órgãos mais seriamente afetados devido ao seu contato constante com a água (MISHRA et al., 1985).

As brânquias dos peixes são constituídas por filamentos ou lamelas primárias arranjados em aros duplos ao longo do osso. As lamelas secundárias são originadas nos filamentos e estão dispostas perpendicularmente às margens inferior e superior de cada filamento, servindo mais para sustentação da lamina secundária, do que para processos de trocas gasosas (ROSETY-RODRÍGUEZ, 2002).

O epitélio branquial é constituído por diferentes tipos celulares, incluindo células pavimentosas ou respiratórias, células mucosas e células clorídricas, sendo estas últimas, em peixes de água doce, envolvidas em atividades de transporte iônico (LAURENT et al., 1985; LAURENT; PERRY, 1990). O número, tamanho, forma e estrutura das células clorídricas pode ser modificado pela exposição a certos fatores ambientais (JAGOE; HAINES, 1997; BRITO, 2009).

As células pavimentosas são caracterizadas por apresentar uma rede de microsulcos em sua superfície (LAURENT, 1982); os microsulcos, geralmente, são considerados

estruturas importantes na retenção de muco no epitélio branquial (LEWIS, 1979), indicativas de aumento da atividade celular (GOSS et al., 1994).

Mazon et al., (2002), estudando os efeitos do cobre nas brânquias de *Prochilodus scrofa*, em observação ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), detectaram uma redução dos microsulcos das células pavimentosas, sendo a razão para esta redução, segundo o autor, desconhecida. Brito (2009) observou esta mesma redução em peixes expostos agudamente a águas de um lago impactado por metais.

Bernet et al. (1999) propuseram um protocolo como ferramenta na histopatologia em peixes. Neste protocolo, o autor divide as alterações histopatológicas em cinco grupos: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia. Os distúrbios circulatórios incluem hemorragias, aneurismas e edemas intercelulares; as alterações regressivas são aquelas que culminam em uma redução funcional ou perda do órgão e, entre outras, podem ser alterações estruturais, como a fusão lamelar, desprendimento do epitélio respiratório, alterações nucleares e necroses; as alterações progressivas levam a um aumento da atividade de células ou tecidos, como a hiperplasia e o aumento da produção de muco; a inflamação é caracterizada por exudados, ativação do sistema endotelial e infiltração; e a neoplasia, caracterizada pela presença de tumores benignos e malignos.

Ao analisar brânquias em cortes histológicos corados com coloração convencional, de diferentes espécies submetidas à águas com diferentes poluentes, outros autores propuseram diferentes funções para as alterações encontradas:

- Mallat (1985) propôs que a fusão lamelar pode ter um caráter protetor, já que diminui a superfície das brânquias. Porém, este tipo de lesão reduz a superfície branquial capaz de realizar trocas gasosas (HEMALATHA; BANERJEE, 1997);
- A hiperplasia do epitélio lamelar pode possuir uma função defensiva, pois aumenta a distância que as substâncias presentes na água têm que percorrer para alcançar a corrente sanguínea (ERKEM; KOLANKAYA, 2000);
- A ruptura do epitélio branquial reflete a ação deletéria direta dos poluentes (TEMMINK et al., 1983);
- Além dessas alterações, outros autores encontraram focos de hemorragia nas brânquias (OKUWOSA; OMEREGIE, 1995; ROSETY-RODRÍGUEZ et al., 2002).

Técnicas histoquímicas podem ser utilizadas para observar certas alterações em alguns tipos celulares, uma vez que estas técnicas identificam com maior detalhe células que apresentam, em seu interior, componentes específicos como proteínas e glicoconjugados.

Jagoe e Haines (1997) utilizaram técnicas histoquímicas para estudar efeitos de água com adição de ácido e alumínio nas brânquias de salmão; observaram diferenças na distribuição, tamanho e forma das células clorídricas. Os autores sugerem que um aumento dessas células e mudanças em sua estrutura pode ocorrer na tentativa de aumentar a captação de íons do ambiente, uma vez que o pH baixo aumenta a saída desses íons.

### **3. OBJETIVOS**

Este projeto teve por finalidade auxiliar na avaliação dos impactos provocados pela presença do níquel sobre a vida aquática, utilizando peixes, oriundos de piscicultura; foram utilizadas a diferentes concentrações de níquel para comparação destas com a concentração limite, estabelecida pelo CONAMA 357/2005. A análise foi realizada sob três óticas diferentes:

- a) Para a análise da superfície das brânquias foi utilizada a ultramorfologia;
- b) para a análise da estrutura do tecido foi utilizada a histologia;
- c) para uma análise mais detalhada dos tecidos, buscando analisar certos tipos celulares e possíveis alterações fisiológicas, foram utilizados testes histoquímicos.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Material biológico**

Foram utilizados espécimes de *O. niloticus* provenientes de piscicultura, com tamanho médio de 10 cm, para evitar diferenças intra-específicas relacionadas ao tamanho e idade dos peixes. Esses animais foram aclimatados em tanques sob condições controladas, a temperatura média de 23°C, com sistema de filtração e aeração. Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da UNESP – Rio Claro, SP (CEUA – IB – UNESP – CRC) e obteve aprovação com o protocolo nº 2649 de 31.03.2010.

### **4.2 Níquel**

Na montagem dos bioensaios foi utilizado o cloreto de níquel hexahidratado PA, da marca Synth, CAS number C.1055.01.AF e peso molecular 237,70.

No Brasil, a resolução do CONAMA, nº 357 de 25 de março de 2005, dispõe sobre o controle e taxa os limites máximos de contaminantes na água. De acordo com essa resolução,



o limite máximo da concentração total de níquel permitida em corpos de água doce é de 0,025 mg/L Ni. Para estimar os efeitos do níquel em peixes, foram utilizadas três concentrações de níquel. A primeira de 0,0125 mg/L, ou seja, metade da concentração máxima definida pelo CONAMA. A segunda concentração utilizada (0,025 mg/L) é o próprio limite de concentração estabelecido pela resolução. A terceira concentração (0,050 mg/L) consistiu no dobro da concentração máxima total de níquel permitida em corpos de água doce.

### **4.3 Bioensaio**

O bioensaio foi realizado em quatro aquários, dos quais um continha água de poço artesiano, sem a adição de nenhum composto, utilizado como grupo controle. Os outros três aquários tiveram a água misturada ao cloreto de níquel, em três diferentes concentrações: a metade da concentração permitida pela legislação (0,0125 mg/L) (tratamento 1); a concentração permitida (0,025 mg/L) (tratamento 2) e o dobro (0,05 mg/L) (tratamento 3). Em todos os aquários foram colocados cinco espécimes, que permaneceram em exposição por 96 horas, para que então fossem retiradas suas brânquias para análise.

### **4.4 Histologia**

Após exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e tiveram o segundo arco branquial retirado e fixado em solução Bouin (15 ml de solução aquosa saturada de ácido pícrico, 5 ml de formaldeído e 1 ml ácido acético), durante aproximadamente 24 horas; em seguida, o material foi mergulhado em tampão fosfato de sódio pH=7,4 e mantido em geladeira.

O material foi desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90, 95% durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de resina de embebição Leica, por 24 horas ou mais e mantido em geladeira. O material foi então colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. Após o endurecimento da resina, o material foi seccionado com auxílio do micrótomo Leica RM2245; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas.

#### **4.4.1 Coloração convencional**

As lâminas foram mergulhadas em hematoxilina de Harris por 6 minutos, depois foram colocadas em água por 4 minutos para que a reação ocorresse. Logo em seguida, as

lâminas foram mergulhadas em eosina aquosa por 5 minutos, lavadas com água corrente, secas e montadas com bálsamo do Canadá.

#### **4.4.2 Histoquímica**

##### **4.4.2.1 Polissacarídeos neutros – Técnica Ácido Periódico-Schiff (PAS) (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Para observação de células mucosas, os cortes do material foram oxidados por 10 minutos em solução de ácido periódico 0,4% e colocados no reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro; foram deixados então em água sulfurosa por 3 minutos e lavados em água corrente, por 30 minutos.

##### **4.4.2.2 Cálcio – Método de von Kossa (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)**

Para a observação de células clorídricas, segundo a proposta de Pereira e Caetano (2009), os cortes foram imersos em nitrato de prata por 20 minutos, lavados em água e transferidos para hidroquinona ou revelador fotográfico; foram então imersos em tiosulfato de sódio ou fixador fotográfico F-5 (Kodak) por 5 minutos e contracorados com hematoxilina. A montagem das lâminas foi feita com gelatina glicerizada.

#### **4.5 Microscopia Eletrônica de Varredura**

O segundo arco branquial dos espécimes expostos foi retirado e fixado em fixador Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) e mantido em geladeira. A desidratação do material foi realizada utilizando uma série de concentrações crescentes de acetona, levado ao ponto crítico e colado em suporte metálico. Foi então analisado ao microscópio eletrônico de varredura de baixo vácuo HITACHI TM3000 e fotografado.

#### **4.6 Análise e documentação dos resultados**

As observações foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss ou Leica e as imagens capturadas utilizando-se programas próprios. Os resultados encontrados nos animais expostos às diferentes concentrações de níquel foram comparados com o grupo controle e com os dados encontrados na literatura.

As células mucosas, evidenciadas pela técnica histoquímica de PAS, foram avaliadas segundo Biagini et al. (2009), de forma que três cortes histológicos, com três lamelas principais íntegras, de cada indivíduo, foram selecionadas para a contagem de células mucosas. Dessas lamelas principais foram contadas as células mucosas de 30 regiões

interlamelares de todos os indivíduos dos quatro tratamentos. Foi realizado o teste Shapiro-Wilk para testar a normalidade dos dados e estes, por apresentarem distribuição normal ( $p > 0,05$ ), posteriormente foram analisados pelo teste ANOVA, onde foi adotado o valor de significância 0,05.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Ultramorfologia

As células pavimentosas constituem grande parte da superfície branquial, sendo de aparência semelhante às impressões digitais, devido à disposição circular de suas cristas. O grupo controle apresentou as células íntegras, sem nenhuma alteração (Figuras 1A e 1E).

A análise ultramorfológica das brânquias dos indivíduos submetidos ao níquel revelou uma diminuição gradual das cristas presentes nas células pavimentosas nos grupos expostos a 0,0125 mg/L (Figura 1B) e perda quase total na concentração de 0,025 mg/L (Figura 1C). O grupo exposto a 0,05 mg/L de níquel apresentou perda das cristas nas células pavimentosas (Figura 1D) e ruptura das células pavimentosas, o que provocou hemorragia (Figura 1F).

A comparação qualitativa dos resultados obtidos pela análise ultramorfológica dos animais do grupo controle e dos tratamentos encontra-se na tabela 1.

**Tabela 1** – Alterações observadas nas brânquias de *O. niloticus* expostos às diferentes concentrações de cloreto de níquel sob microscopia eletrônica de varredura

Tratamento	Parâmetros avaliados		
	Ruptura das células pavimentosas	Perda das cristas	Hemorragia
Controle	-	-	-
Tratamento 1	+	++	-
Tratamento 2	++	+++	-
Tratamento 3	++	++	+

- ausência de alterações, + alterações que ocorreram raramente, ++ alterações que ocorreram moderadamente, +++ alterações que ocorreram frequentemente em grandes áreas da superfície branquial.

### 5.2 Histologia

O grupo controle apresentou o padrão branquial descrito por Fanta et al. (2002) para peixes teleosteos (Figura 2A). Os animais observados apresentaram arcos branquiais formados por filamentos primários (lamelas primárias), tendo cada filamento primário

lamelas respiratórias (lamelas secundárias) alinhadas ao longo de seus dois lados. Os filamentos primários são cobertos por epitélio pavimentoso estratificado e possuem espaços de sangue limitados por células pilares, separada do epitélio por uma grossa membrana basal. Hemácias elípticas e nucleadas são vistas dentro do espaço do sangue em cortes longitudinais das lamelas secundárias (Figura 3A).

Todos os animais dos tratamentos apresentaram alterações morfológicas nas lamelas secundárias. A alteração mais frequentemente observada foi o desprendimento epitelial, cuja frequência foi diretamente proporcional ao aumento das concentrações de níquel analisadas (Figuras 2B, 2C e 2D). A perda da integridade das lamelas, culminada pela ruptura das mesmas, foi observada nos animais dos tratamentos 2 (Figura 3B) e 3 (Figura 3C), e a hemorragia (Figura 3D) foi identificada no tratamento 3 pela grande quantidade de hemácias nos espaços interlamelares.

**Tabela 2** – Alterações histológicas observadas nas brânquias de *O. niloticus* expostas às diferentes concentrações de cloreto de níquel

Tratamento	Parâmetros avaliados		
	Desprendimento epitelial	Perda da integridade do epitélio das lamelas	Hemorragia
Controle	-	-	-
Tratamento 1	+	-	-
Tratamento 2	++	+	-
Tratamento 3	+++	++	+

- ausência de alterações, + alterações que ocorreram raramente, ++ alterações que ocorreram moderadamente, +++ alterações que ocorreram frequentemente em grandes áreas da superfície branquial.

### 5.3 Histoquímica

Na análise realizada para a observação de células clorídricas, tanto o grupo controle quanto os tratamentos não apresentaram resposta positiva à técnica de detecção de cálcio, não evidenciando, portanto, a presença de células clorídricas.

Com a análise das células mucosas evidenciadas pelo PAS (Figura 4A) pode-se verificar que o número dessas células aumentou nos grupos expostos (Figuras 4B, 4C e 4D), quando comparadas ao número observado no controle (Tabela 1). O tratamento 2 foi o que apresentou o maior número de células mucosas, seguido dos tratamentos 1 e 3. No entanto,

pelo teste estatístico utilizado, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p=0,292$ ).

**Tabela 3** – Média (M) e desvio padrão (DP) de células mucosas quantificadas entre as lamelas secundárias de *O. niloticus* do grupo controle e expostos às diferentes concentrações de cloreto de níquel

Tratamento	Células Mucosas				
	Máxima	Mínima	M±DP	Frequência	N total
<b>Controle</b>	444	127	287±112,41	53,14%	1435
<b>Tratamento 1</b>	492	286	373,8±87,32	69,22%	1869
<b>Tratamento 2</b>	676	291	442,6±183,97	81,96%	2213
<b>Tratamento 3</b>	444	264	287±75,58	67,85%	1832

## 6. DISCUSSÃO

O tecido branquial apresenta dois tipos de resposta celular, a de defesa e a compensatória (MALLAT, 1985; TAKASHIMA; HIBIYA, 1995). Ambas as respostas ajudam a barrar a entrada de substâncias tóxicas, impedindo que essas substâncias alcancem a corrente sanguínea e, em menor proporção, auxiliam na prevenção dos danos causados pela exposição direta (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

Evans (1987) comenta que não está claro se os poluentes produzem, diretamente, os efeitos observados no epitélio branquial, ou, mais provavelmente, se são alterações secundárias causadas pela ação dos poluentes em receptores de união à membrana das células epiteliais. Desta forma, sabe-se apenas que a exposição ao poluente causa a alteração no tecido, e que a retirada deste poluente do ambiente faz com que as alterações regridam (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002).

O desprendimento epitelial observado nas brânquias dos peixes submetidos ao níquel tem sido descrito também por diversos autores, em diferentes espécies submetidas a diversos poluentes. Esta alteração foi citada por Randi et al. (1996) em peixes sob influência do cádmio e por Arellano et al. (1999) na espécie *Solea senegalensis*, exposta ao cobre.

O desprendimento epitelial é uma alteração regressiva, cuja finalidade é reduzir funcionalmente o órgão atingido, e desta forma, diminuir a contaminação do animal pela substância tóxica (BERNET et al., 1999).

De acordo com Pereira e Caetano (2009), as células clorídricas são grandes, espalhadas na superfície das lamelas, ricas em mitocôndrias e participam no processo de

transporte ativo de íons, são mais comumente encontradas nos peixes de água salgada, mas também está presente em peixes de água doce. Fatores ambientais podem influenciar seu número, tamanho, forma e estrutura (JAGOE; HAINES, 1190). Neste estudo, não foram observadas células clorídricas, não sendo possível afirmar se o níquel interfere na sua proliferação ou presença.

Tan and Lim (1984) relataram que o aumento das células mucosas é o primeiro sintoma visível de toxicidade em *Perna viridis*, exposto ao chumbo. Segundo Takashina e Hibiya (1995), a hipersecreção pode ser o resultado de uma resposta crônica contra infecções parasitárias ou bacterianas ou contra produtos químicos irritantes. O muco é normalmente encontrado nos filamentos, mas pode ser encontrado no epitélio respiratório de peixes expostos a condições de estresse, o que pode sugerir que a camada formada pela produção de muco protege as superfícies lamelares contra os agentes tóxicos, infecciosos e partículas em suspensão (MALLAT, 1985). Devido a função de proteção do tecido que o muco apresenta (BERNET et al., 1999), o aumento de células mucosas é um indicativo de presença de substâncias tóxicas na água, e, como apresentado nos resultados, o aumento foi observado em todos os tratamentos (embora estatisticamente não significativo), indicando que o níquel se apresenta tóxico nas três concentrações utilizadas neste estudo, mesmo no limite permitido por lei e sua metade.

As células pavimentosas constituem a maior parte da superfície branquial; são caracterizadas por serem constituídas por cristas em suas superfícies, as quais, segundo Mallat (1985), são importantes na retenção de muco no epitélio branquial, como uma forma de proteção contra alterações ambientais. Desta forma, uma redução dessas cristas, como foi observada neste estudo, indica uma resposta do órgão afetado em relação ao contaminante, sendo essa resposta do tipo regressiva, segundo protocolo de Bernet et al. (1999). Wong e Wong (1999) observaram redução das cristas nas brânquias de *O. mossambicus* submetidas a diferentes concentrações de cádmio.

A hemorragia observada nos animais do tratamento 3, é classificada como distúrbio circulatório (BERNET et al., 1999). Aparentemente as células pavimentosas perdem aderência uma as outras, resultando numa ruptura do tecido, causando a hemorragia, fazendo com que o órgão atingido perca a sua funcionalidade, diminuindo desta forma, a contaminação pelo agente tóxico.

## 7. CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas e dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- a) A análise ultramorfológica das brânquias de tilápias expostas às três diferentes concentrações de níquel foi eficiente para detectar a perda da integridade das células pavimentosas e das cristas dos animais de todos os tratamentos;
- b) Pela análise histológica foi possível observar um desprendimento epitelial nas brânquias de todos os animais, em todos os tratamentos com cloreto de níquel;
- c) Pela análise histoquímica foi possível observar que o níquel não induz a proliferação de células clorídricas, entretanto, observou-se um aumento dose-dependente de células mucosas, de todos os animais, em todos os tratamentos com cloreto de níquel.

Portanto, o níquel apresenta potencial tóxico aos peixes, desde a menor concentração utilizada (a metade da concentração permitida por lei) até o dobro desta, indicando que a resolução CONAMA deveria ser revista e reavaliada para este parâmetro, uma vez que, observou-se interferência deste metal na histofisiologia dos animais aquáticos.

## 8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALVES-COSTA, J.R.M. **Biomarcadores de contaminação em peixes de água doce, por contaminação em chumbo (II):** ensaios laboratoriais com *Hoplias malabaricus* e *Oreochromis niloticus*. Curitiba: [s.n.], 2001. Dissertação de mestrado, Departamento de Biología Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 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, 62-72, 1999.
- ATEEQ, B.; M. ABUL FARAH, M.; NIAMAT, A.; WASSEM, A. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, v.518, p.135-144, 2002.
- BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of fish diseases**, v.22, p.25-34, 1999.
- BIAGINI, F.R.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, v.40, p.839-844, 2009.
- BRITO, L.T. **Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lântico.** Trabalho de conclusão de curso (TCC). UNESP – IB – Rio Claro/SP, 2009.
- CAMPOS, M.L.A.M.; BRENDO, A.; VIEL, F.C. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle de contaminação para a determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v.25, n.5, p.808, 2002.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v.72, p.722-725, 2008.
- CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill Tissue Recovery after Copper Exposure and Blood Parameter Responses in the Tropical Fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, n. 2, p. 83-91, 2002.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Variáveis de qualidade das águas.** Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#cobre>. Acessado em: 20/01/2010.
- CHRISTOFOLETTI, C.A.; DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus*: a methodological comparison. **Genetics and molecular biology**, v. 32, p.155-158, 2009.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução 357/2005.** Disponível em: [http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res\\_conama\\_357\\_05.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/praias/res_conama_357_05.pdf). Acessado em 24/01/2010.



DAVID, J.A.O.; FONTANETTI, C.S. Surface morphology of *Mytella falcata* gill filaments from three regions of the Santos estuary. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v.22, p.203-210, 2005.

DAVID, J.A.O.; SALAROLI, R.B.; FONTANETTI, C.S. The significance of changes in *Mytella falcata* (Orbigny, 1842) gill filaments chronically exposed to polluted environments. **Micron**, v.39, p.1293-1299, 2008.

DELEEBEECK, N. M. E.; SCHAMPHELAERE, K. A. C.; JANSSEN, C. R. A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural. **Waters Ecotoxicology and Environmental Safety** v.67, 1-13, 2007.

DORESWAMY, K.; SHRILATHA, B.; RAJESHKUMAR, T.; MURALIDAHARA. Nickel-induced oxidative stress in testes of mice: evidence of DNA damage and genotoxic effects. **Journal of Andrology**, v.25, n.6, p.996–1003, 2004.

ERKEM, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v.64, p.418 – 425, 2000.

EVANS, D. H. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspect**, v.71, p.47-58, 1987.

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**, New York, v. 54, p. 119-130, 2002.

GOSS, G.G.; LAURENT, P.; PERRY, S.F. Gill morphology during hypercapnia in brown bulhead (*Ictalurus nebulosus*): Role of chloride cells and pavement cells in acid base regulation. **Journal of fish diseases**, v.45, p.706-718, 1994.

HARSHBARGER, J. C.; CLARK, J. B. Epizootiology of neoplasms in bony fish of North-America. **Science of the Total Environmental**, Amsterdam, v.94, n.1-2, p.1-32, 1990.

HAUPTMAN, O.; ALBERT, D.M.; PLOWMAN, M.C.; HOPFER S.M.; SUDERMAN F.W Jr. Ocular malformations of *Xenopus laevis* exposed to nickel during embryogenesis. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v.23, n.6, p.397–406, 1993.

HEMALATHA, S.; BANERJEE, T. K. Histopathological analysis of sublethal toxicity of zinc chloride to the respiratory organs of the airbreathing catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). **Biological research**, v.30, p.11-21, 1997.

HOSHINA, M.M.; ANGELIS, D.F.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation research**, v.656, p.44–48, 2008.

HOSHINA, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Micronucleus and chromosome aberrations induced in onion (*Allium cepa*) by a petroleum refinery effluent and by river water that receives this effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, doi:10.1016/j.ecoenv.2009.07.002, 2009.

IARC - International Agency for Research on Cancer. IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding. v.49, p.1-691. Lion. 1990.

JAGOE, H.C.; HAINES, T.A. Changes in gill morphology of Atlantic salmon (*Salmo salar*) Smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. **Environmental Pollution**, v.97, n.1-2, p.137-146, 1997.

JUNQUEIRA, L.C.U.; JUNQUEIRA, M.M.S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1983, 123p.

KARNOVSKY, M.J.; A formaldehyde-glutaraldehyde fixative at high osmolarity for use in electron microscopy. **Journal Cell Biology**, v.11, p.137-140, 1965.

KASPRZAK, K.S.; BAL, W.; KARACZYN, A.A. The role of chromatin damage in nickel-induced carcinogenesis. A review of recent developments. **Journal of Environmental Monitoring**, v.5, n.2, p.183-187, 2003.

KIKUCHI, M.; WAKABAYASHI, M.; KOJIMA, H.; YOSHIDA, T. Uptake, distribution and elimination of sodium linear alkylbenzene sulfonate and sodium alkyl sulfate in carp. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.2, p.115-127, 1978.

LAURENT, P. Structure of vertebrate gills. In.: **Gills**. HOULIHAN, D.F.; RANKIN, J.C.; SHUTTLEWORTH, T.J. (eds). Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 228p. 1982.

LAURENT, P.; HOBE, H.; DUNEL-ERB, S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell and Tissue Research**, v.240, p.675-692, 1985.

LAURENT, P.; PERRY, S.F. Effect of cortisol on gill chlorid cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell and Tissue Research**, v.259, p.429-442, 1990.

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

LEME D.M.; MARIN-MORALES, M.A. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* exposed to petroleum polluted water - A case study. **Mutation research**, v.650, p.80-86, 2008.

LEWIS, S.V. A scanning electron microscope study of gills of the air breathing catfish, *Clarias batrachus*. **Journal of fish biology**, v.15, p.381-384, 1979.

KLEIN, C.B.; COSTA, M. Nickel. In: **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3<sup>th</sup> edition, p.743, 2007.

MALLAT, 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.

MARIA, V. L.; CORREIA A. C.; SANTOS M. A. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary treated effluents on *Anguilla anguilla* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.55, p.126-137, 2003.

MARQUES, A.L.B.; CHIERICE, G.O. Trace nickel determination with phenyldithiocarbamate in sea water, by adsorptive stripping voltammetry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.04, n.1, p.17-19, 1993.

MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v.69, n.4, p.399-408, 2004.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and molecular biology**, v.29, p.148-158, 2006.

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.

MCKIM, J. M.; ERICKSON, R. J. Environmental Impacts on the Physiological Mechanisms Controlling Xenobiotic Transfer across Fish Gills. **Physiological Zoology**, v. 64, n. 1, p. 39-67, 1 jan 1991.

MISHRA, V.; LAL, H.; CHAWLA, G.; VISWANATAN, P. N. Pathomorphological changes in the gills of fish fingerlings (*Cirrhina mimgala*) by lineal alkylbenzene sulfonate. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.10, p.302-308, 1985.

MOORE, J.W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters**. New York: Springer-Verlag, 1984. 328p.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In **Fish Ecophysiology**. Rankin, J. C.; Jensen, F. B. (Eds). London: Chapman & Hall, 1993. pp. 231-264.

OKUWOSA, V.N.; OMEREGIE, E. Acute toxicity of alkylbenzene sulphonate (ABS) detergent to the toothed carp, *Aphyosemion gairdneri*, L. **Aquaculture Research**, v.26, p.755-758, 1995.

PEREIRA, B.F.; CAETANO, F.H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**, v.40, p.783-786, 2009.

POWERS, D.A. Fish as model systems. **Science**, Washington, v.246, n.4928, p.352-358, 1989.

SOUZA, T.S.; FONTANETTI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, Amsterdam, v.605, p.87-93, 2006.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; GONÇALVES, R.A.; FONTANETTI, C.S. The *Allium cepa* bioassay to evaluate landfarming soil, before and after the addition of rice hulls to accelerate organic pollutants biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1363-1368, 2009.

RANA, S. V. S. Metals and apoptosis: Recent developments. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 22, n. 4, p. 262-284, nov 2008.

RANDI A. S.; MONSERRAT, J. M.; RODRIGUEZ, E. M. ; ROMANO L. A. Histopathological effects of cadmium on the gills of the freshwater fish, *Macropsobrycon uruguayanae* Eigenmann (Pisces, Atherinidae). **Journal of Fish Diseases** v.19, 311–322, 1996.

ROEKENS, Z.K.; GRIELI, V.R. Analysis of Rain Water by Differential Pulse Stripping Voltammetry in Nitric Acid Medium. **Acta**, v.204, p.179-187, 1988.

ROSETY-RODRÍGUEZ, M.; ORDOÑEZ, F. J.; ROSETY M.; ROSETY, J. M.; ROSETY, I.; RIBELLES, A.; CARRASCO, C. Morpho-histochemical Changes in the Gills of Turbot, *Scophthalmus maximus* L., Induced by Sodium Dodecyl Sulfate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.223-228, 2002.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T.H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMÜLLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p.183-191, 1998.

TAN, W.H., LIM, L.H. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis*. **Aquaculture**, v.42, p.317–332, 1984.

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

TEMMINK, J.; BOWMEISTER, P. DE JONG P.; VAN DER BERG, J. An ultra structural study of chromate-induced hyperplasia in the gill of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Aquatic Toxicology**, v.4, p.165-179, 1983.

VIJAYAN, M. M.; MORGAN, J. D.; SAKAMOTO, T.; GRAU, E. G.; IWANA, G. K. Food deprivation effects sewerage acclimation in Tilapia: hormonal and metabolic changes. **Journal Experimental Biology**, v.199, p.2467-2475, 1996.

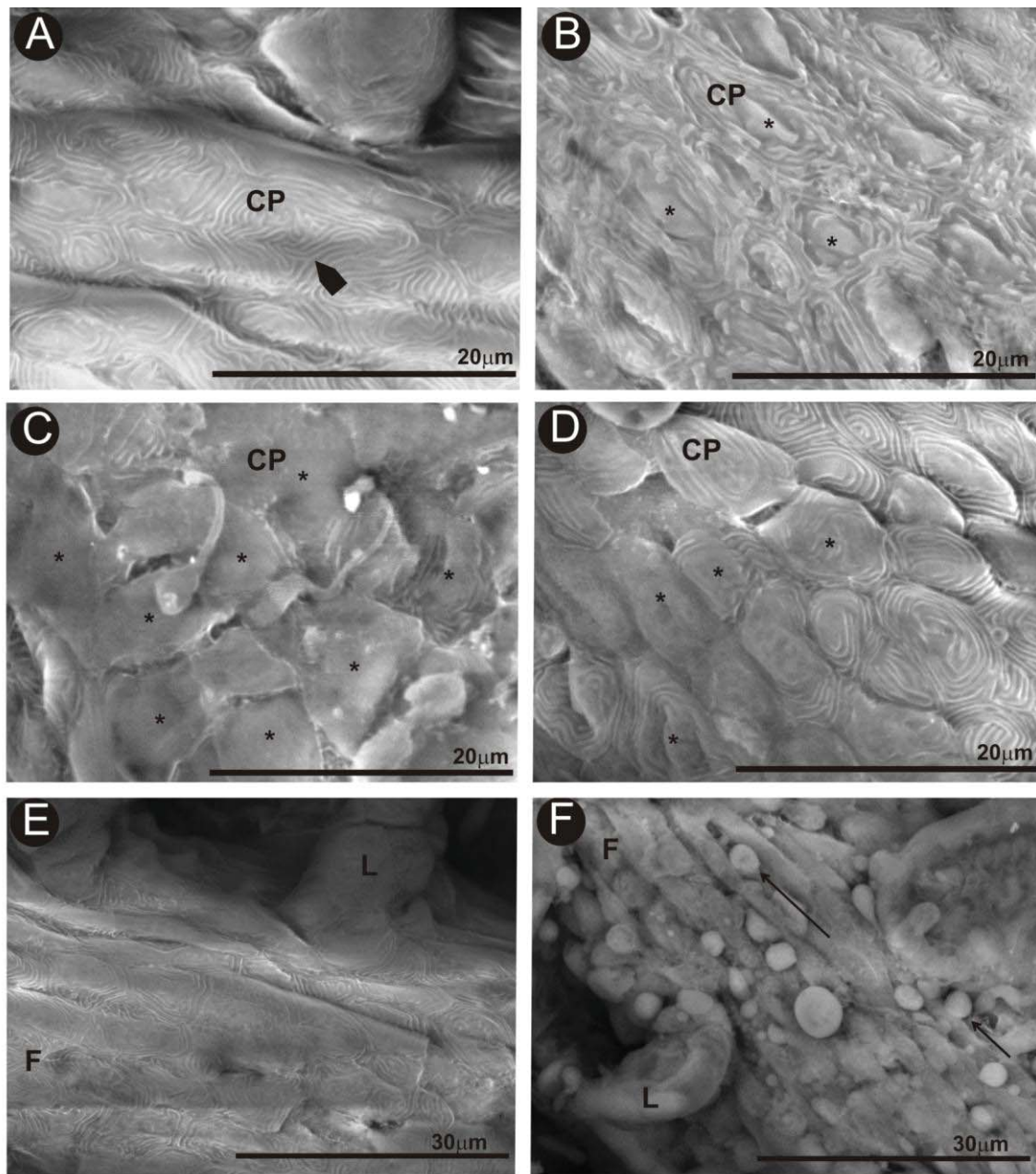
VILAPLANA, J.; ROMAGUERA, C.; GRIMALT, F., CORNELLANA, F. New trends in the use of metals in jewelry. **Contact Dermatitis**, v.25, p.124-148, 1991.

WENDELAAR BONGA, S. E.; LOCK, R. A. C. Toxicants and Osmoregulation in Fish. **Netherlands Journal of Zoology**, v. 42, n. 2-3, p. 478-493, 1991.

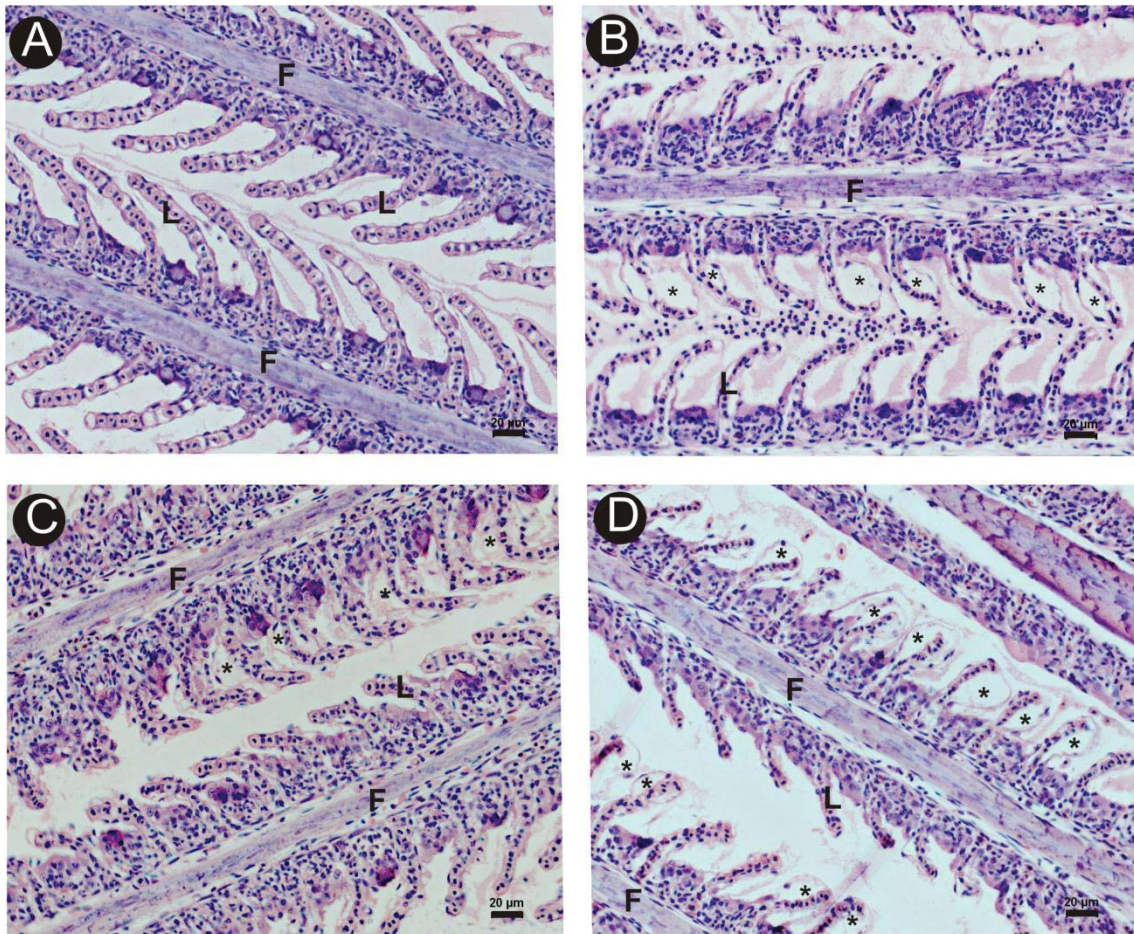
WONG, C. K. .; WONG, M. . Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 517-527, abr 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). "Nickel" International Progress Chemical Safety, Environmental Health Criteria 108, p.1-383, 1991.

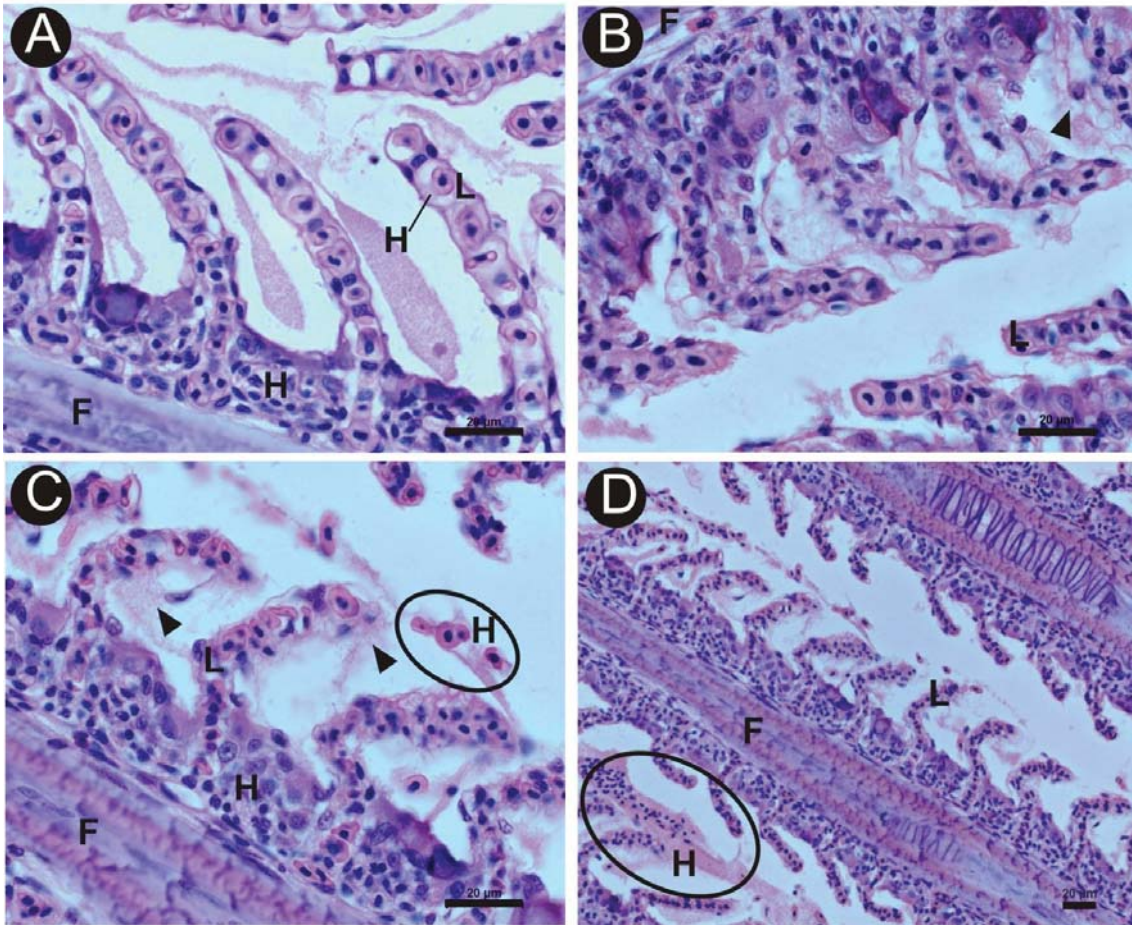
YOKOI, K.; UTHUS, E.O.; NIELSEN, F.H. Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. **Biological Trace Element Research**, v.93, p.141-154, 2003.



**Figura 1:** Micrografias eletrônicas de varredura de brânquia de *O. niloticus*. A e E: Grupo controle; B: Tratamento 1; C: Tratamento 2; D e F: Tratamento 3. F: filamento primário; L: lamela secundária; CP: célula pavimentosa; cabeça de seta: cristas; \*: células pavimentosas com perda de cristas, seta: ruptura das células pavimentosas com liberação de células sanguíneas.

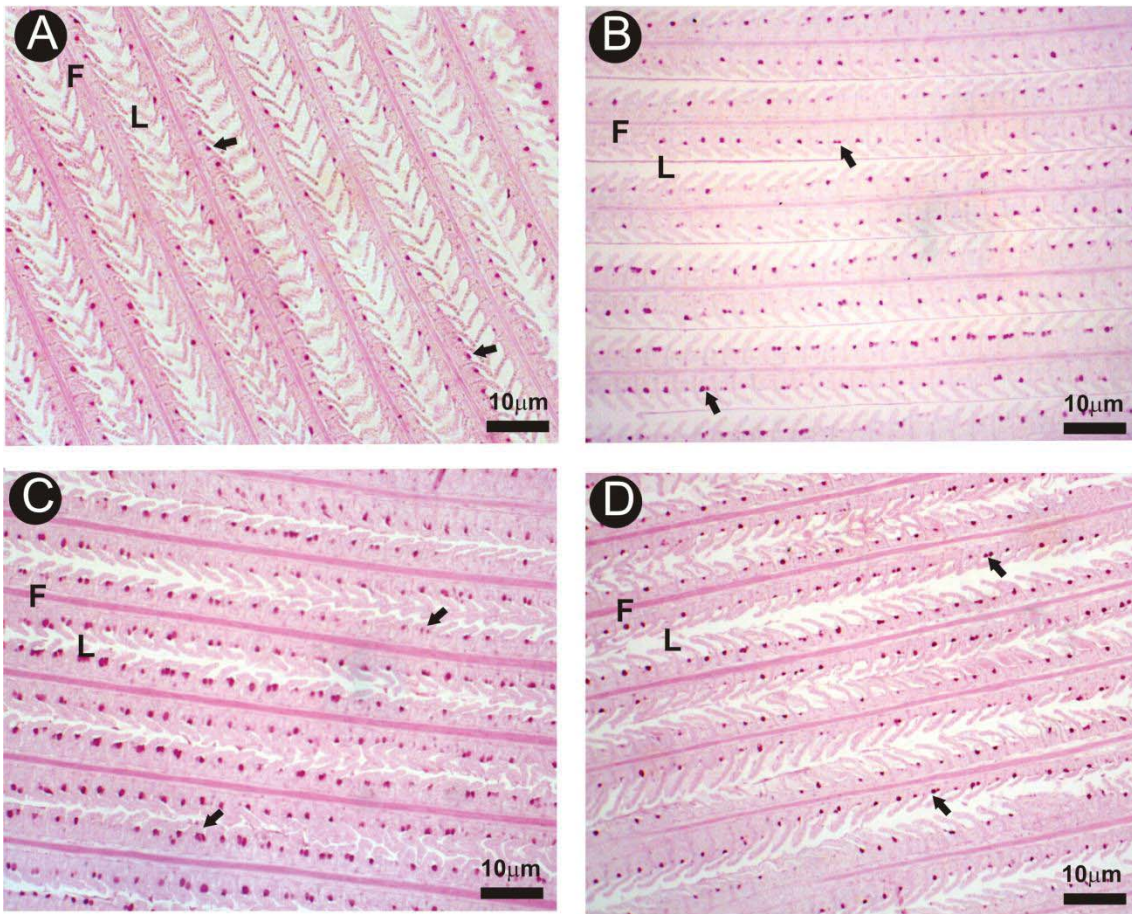


**Figura 2:** Seções histológicas de brânquia de *O. niloticus*. A: Grupo controle; B: Tratamento 1; C: Tratamento 2; D: Tratamento 3. F: filamento primário; L: lamela secundária; \*: desprendimento epitelial.



**Figura 3:** Seções histológicas de brânquia de *O. niloticus*. A: Grupo controle; B: Tratamento 2; C e D: Tratamento 3. F: filamento primário; L: lamela secundária; Triângulo: perda da integridade das lamelas; H: hemácias; Círculo: hemácias externas as lamelas, hemorragia.





**Figura 4:** Seções histológicas de brânquia de *O. niloticus* submetidas a técnica do PAS. A: Grupo controle; B: Tratamento 1; C: Tratamento 2; D: Tratamento 3. F: filamento primário; L: lamela secundária; Seta: célula mucosa.