



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS - RIO CLARO




---

Ciências Biológicas - Integral

---

**Bruno Fiorelini Pereira**

HISTOLOGIA COMPARADA DE  
BRÂNQUIAS, FÍGADO E SANGUE EM  
PEIXES DA ESPÉCIE *Prochilodus lineatus*,  
EXPOSTOS A ÁGUAS CONTAMINADAS



Rio Claro  
2009

Bruno Fiorelini Pereira

**HISTOLOGIA COMPARADA DE BRÂNQUIAS, FÍGADO E SANGUE EM  
PEIXES DA ESPÉCIE *Prochilodus lineatus*, EXPOSTOS A ÁGUAS  
CONTAMINADAS**

Orientador: FLÁVIO HENRIQUE CAETANO

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

Rio Claro  
2009

597  
P436h

Pereira, Bruno Fiorelini  
Histologia comparada de brânquias, fígado e sangue em peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, expostos a águas contaminadas / Bruno Fiorelini Pereira. - Rio Claro : [s.n.], 2009  
70 f. : il., figs., gráfs.  
Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências  
Orientador: Flávio Henrique Caetano  
1. Peixe. 2. Toxicologia. I. Título.  
Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP Campus de Rio Claro/SP

## SUMÁRIO

---

1 - RESUMO	5
2 - INTRODUÇÃO	7
2.1 – Biologia do <i>Prochilodus lineatus</i>	11
3 - MATERIAIS	12
4 - MÉTODOS	13
4.1 – Técnicas Histoquímicas	14
Hematoxilina e Eosina (HE):	14
PAS (Ácido Periódico de Schiff)	14
Azul de Bromofenol	15
Picrosirus Red	15
Prata Amoniacal	15
Feulgen	16
Von Kossa	16
Leishman	17
4.2 – Fixadores	17
Bouin	17
Formol Neutro	17
5 - RESULTADOS	18
5.1 – Análises do sangue	18
5.2 - Análise do fígado	34
5.3 - Análise das brânquias	49
6 - DISCUSSÃO	62
6.1 - Análises do sangue	62
6.2 - Análise do fígado	63
6.3 - Análise das brânquias	65
7 - CONCLUSÃO	67
7.1 - Análises do sangue	67
7.2 - Análise do fígado	67
7.3 - Análise das brânquias	67
8 - REFERÊNCIAS	68

## 1 - RESUMO

---

Os estudos hematológicos das diferentes espécies de peixes são de interesse ecológico e fisiológico, auxiliando na compreensão da relação entre as características sanguíneas, a filogenia, a atividade física, o hábitat e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente. No experimento realizado foram testados os efeitos de águas contaminadas em parâmetros hematológicos de peixes da espécie *Prochilodus lineatus*, em períodos de coleta de 7 e 20 dias, nos quais o sangue foi coletado com seringas heparinizadas, foram montadas lâminas de esfregaço, as quais foram coradas pelo corante de Leishman. Estas lâminas foram analisadas e fotografadas com o auxílio de um microscópio óptico Leica, no qual foram feitas contagens totais de células brancas e contagens diferenciais de trombócitos e leucócitos, para a análise estatística. O grupo exposto ao Lago Azul apresentou uma elevação no número de leucócitos e no total de células brancas, evidenciando que os contaminantes químicos do ambiente estavam atuando de forma semelhante a um antígeno no corpo do animal fazendo com que suas células de defesa se proliferassem. Quanto ao grupo exposto ao detergente, observou-se que após os vinte dias de experimento ocorreu uma diminuição no número de trombócitos. Tais resultados evidenciam que a variação no número de leucócitos apresentou-se como um indicador de poluição ambiental e que os detergentes biodegradáveis podem em certo tempo de exposição ocasionar um déficit em funções vitais de peixes como à coagulação e a prevenção contra infecções, eventos ligados diretamente com os trombócitos.

A maioria dos vertebrados aquáticos possui brânquias, estruturas especializadas nas trocas gasosas e responsáveis por grande parte das trocas iônicas. Este órgão acaba por absorver grande parte das substâncias presentes na água, que ao caírem na corrente sanguínea são filtradas no fígado. Neste experimento foram analisados, através de técnicas de histoquímica, os efeitos de poluentes nestes órgãos vitais aos peixes. Observou-se em ambos os órgãos modificações morfológicas e nos acúmulos de substâncias, que demonstraram a diminuição da capacidade destes órgãos de realizarem suas funções. Nas brânquias foi observada a proliferação de células de muco e de cloro que evidenciam o desequilíbrio iônico gerado pelos poluentes. Os resultados

obtidos demonstram que os poluentes testados, mesmo em diluições elevadas, no caso do detergente, afetam diretamente os tecidos dos peixes expostos a estes contaminantes e os debilitam.

## 2 - INTRODUÇÃO

---

O principal canal de drenagem fluvial do município de Rio Claro é o Rio Corumbataí, que ao longo de seu curso, em perímetro urbano, recebe contribuições de afluentes como o Ribeirão Claro e o córrego Servidão. O córrego Servidão, que nasce próximo à Rodovia Washington Luís e, segundo De Mauro (1993), sofreu por um longo período com a deposição de efluentes advindo da Empresa Química Nheel.

Em 1970, o Córrego da Servidão foi represado originando o "Lago Azul", situado no perímetro urbano de Rio Claro – SP - Brasil. Devido a sua localização geográfica, as águas provenientes do escoamento superficial das ruas dos bairros, situados à montante, carreavam grande carga de sedimentos (terra, lixo, entulho) para o Lago, fato que resultou em seu assoreamento gradual, culminando na formação de um brejo.

Na década de 80, após a construção do Centro Cultural "Roberto Palmari", iniciou-se um processo de recuperação do Lago Azul, que contemplou seu desassoreamento, a arborização de seu entorno, a instalação de equipamentos de lazer e a abertura do lago para pesca e sua transformação da área em Parque Municipal. O Córrego da Servidão passou por obras de canalização e atualmente encontra-se confinado sob a Avenida Visconde do Rio Claro, entretanto, problemas de inundação, infiltração, erosão e contaminação das águas por esgoto são verificados em diferentes pontos deste córrego e também no Lago Azul.

Estes problemas são resultantes da ineficiência do processo de planejamento das obras, pois antes do represamento e da alteração do curso do córrego fazia-se necessário um planejamento sério que contemplasse a preservação e a recuperação da vegetação, bem como a organização da ocupação das encostas e do vale do Córrego da Servidão.

Preocupada com a possível contaminação das espécies existentes no lago, a prefeitura de Rio Claro proibiu a pesca e, juntamente com a SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado São Paulo), iniciou um estudo das águas e sedimentos do Lago Azul. Cabe ressaltar que, sendo o Lago Azul um represamento do córrego da Servidão, afluente direto do Rio Corumbataí,

este corpo d'água fluvial, bem como sua fauna, são diretamente afetados pelos despejos e impactos impostos ao Lago.

Populações de peixes são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja a introdução de espécies exóticas, de detritos industriais ou residuais, derramamento de óleo, de pesticidas ou de outros agentes, que podem afetar diretamente a ecologia e a sobrevivência das espécies.

Os detergentes biodegradáveis, compostos à base de dodecil-benzeno-sulfonado de sódio, são considerados detergentes brandos, por possuírem uma cadeia lateral linear alifática. Os detergentes utilizados atualmente têm sido alvo de críticas. Não se trata apenas do problema da biodegradação, mas também do elevado teor de fosfato (de até 50%) que aumenta a eficiência na limpeza e é responsável, quando as águas residuais são despejadas em rios e lagos, pelo aumento de velocidade de crescimento e reprodução de algas e ervas daninhas, um processo conhecido como eutrofização, que faz com que diminua o teor de oxigênio disponível nas águas, com efeitos graves sobre a vida animal (Allinger et al., 1978).

A maioria dos vertebrados aquáticos possui brânquias, estruturas especializadas nas trocas gasosas. As brânquias dos peixes estão posicionadas em bolsas faríngeas. O fluxo de água é geralmente unidirecional – entrando pela boca e saindo pelas brânquias. O arranjo vascular nas brânquias maximiza a troca de oxigênio. Cada filamento branquial possui duas artérias, um vaso aferente, que vai do arco branquial até a ponta do filamento, e um vaso eferente, o qual retorna o sangue para o arco. As brânquias devem ser permeáveis ao oxigênio e ao dióxido de carbono, também são permeáveis à água. Como resultado, a maioria dos movimentos da água e dos íons ocorre através das superfícies das brânquias (Pough et al, 2003). Revestindo o arco branquial, os rastos, os filamentos branquiais e as regiões interlamelares, encontram-se o epitélio branquial. Esse epitélio é estratificado e composto por diversos tipos celulares, incluindo as células pavimentosas, as células secretoras de muco e as células de cloro, além de botões gustativos e células de suporte não diferenciadas (Machado, 1999). As células de cloro são grandes, encontram-se esparsas na superfície lamelar, são ricas em mitocôndrias e atuam em processos de transporte ativo de íons (Machado, 1999; Perry, 1997). Segundo Evans (2008), desde o início dos estudos fisiológicos, numerosos grupos têm demonstrado que as células de cloro em grande variedade de teleósteos podem manifestar Na-K-ATPase ativas e devido ao grande número de mitocôndrias presentes nestas células, elas também são conhecidas como células ricas em

mitocôndrias ou MRC. Segundo Perry (1997), vários estudos sugerem que as células de cloro são os sítios ativos da regulação do transporte de íons em peixes marinhos e de água doce; a regulação, sobretudo em peixe marinhos pode representar uma parcela substancial do orçamento energético, devido à hidrólise de ATP pelos vários transportadores íon-ATPases. Estes incluem  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase de alta afinidade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e, talvez, o mal-definido  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$  - ATPase. Em condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, ocorre a proliferação das células de cloro nos filamentos e na superfície lamelar da brânquia (Perry, 1997). Segundo Perry & Walsh (1989), as células de cloro possuem taxa metabólica mais elevada do que a encontrada nas outras células da brânquia e que a taxa metabólica do restante da brânquia afeta diretamente na população de células de cloro, podendo gerar a proliferação das mesmas.

Enquanto a grande superfície é favorável a trocas gasosas, pode também causar vários problemas, incluindo fluxos energeticamente desfavoráveis de água e íons. Como resultado, os peixes apresentam a superfície respiratória que se iguala a sua demanda de oxigênio. Quando se deparam com mudanças em sua necessidade por obtenção de oxigênio, devido à alteração em suas atividades físicas ou a alterações no nível de oxigênio do ambiente, os peixes possuem dois ajustes amplamente conhecidos: mudar o fluxo de água nas brânquias ou mudar o fluxo de sangue no interior das brânquias. Segundo Nilsson (2007), recentemente foi constatado que alguns teleósteos possuem uma terceira opção: remodelar a morfologia das brânquias. Neste contexto, a análise das mudanças morfológicas constitui-se numa ferramenta eficiente para diagnosticar e identificar as conseqüências fisiológicas de contaminações quase letais (Romão et al 2006).

O sangue é um tecido fluido composto de um plasma líquido e de constituintes celulares conhecidos como células sanguíneas vermelhas (eritrócitos) que contêm hemoglobina, a proteína rica em ferro, em diversos tipos diferentes de células sanguíneas brancas (leucócitos), envolvidas no sistema imune de defesa do corpo (Pough et al 2003). O sangue dos peixes teleósteos é formado por eritrócitos, leucócitos e trombócitos. Os peixes possuem uma singularidade que é a presença de núcleo em suas células vermelhas. Leucócitos imaturos são, geralmente, observados nas extensões sanguíneas dos teleósteos hígidos ou não, que resultam de estímulos externos e internos. Esses leucócitos podem variar de tamanho, podendo assemelhar-se a linfócitos ou a pequenos monócitos e apresenta citoplasma de coloração intensamente basófila (Tavares – Dias & Moraes 2004).

O fígado é um órgão muito irrigado, devido as suas funções de processar e armazenar os nutrientes absorvidos no trato digestivo e de neutralização e eliminação de substâncias tóxicas. O fígado é composto basicamente por hepatócitos, que são células poliédricas, com seis ou mais superfícies (Junqueira & Carneiro 2004). Por ser o principal órgão no processo de detoxificação de xenobióticos o fígado está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (Maduenho et. al 2007). Em estudos realizados por Maduenho & Martinez (2007) na espécie *P. lineatus*, foi possível identificar estágios de degeneração do fígado após a exposição dos animais a DFB, sendo que o estágio I foi caracterizado por apresentar agregados de melanomacrófagos, hipertrofia celular e nuclear e núcleos dos hepatócitos deslocados para a periferia; o segundo estágio apresenta vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos.

Segundo Simonato et al (2007), peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações em seus fígados como hipertrofia do núcleo, núcleos em posição lateral, vacuolização do citoplasma, degeneração do citoplasma, entre outras. Em estudos toxicológicos feitos por Jiraungkooskul et. al. (2002), com herbicidas demonstraram proliferação das células das lamelas secundárias, hiperplasia, fusão lamelar e aneurisma na brânquia, vacuolização e picnose nuclear no fígado e dilatação do espaço de Bawman's no rim em peixes da espécie *Oreochromis niloticus*; em estudo semelhante, Aguiar et. al. (2004) demonstraram que em *Anguilla anguilla*, o fenitrothion, um outro tipo de herbicida, causou redução do nível de glicogênio no fígado e no músculo.

Segundo Maduenho et. al (2007) peixes da espécie *P. lineatus* expostos ao Dimilin® apresentaram uma série de alterações histológicas no fígado sendo as de maior frequência de ocorrência: aumento do volume nuclear e celular, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, vacuolização nuclear e estagnação biliar e suas brânquias apresentaram elevação epitelial, hiperplasia e hipertrofia das células epiteliais, fusão lamelar e aneurisma.

## 2.1 – Biologia do *Prochilodus lineatus*

As espécies da família Prochilodontidae (onde está incluído o gênero *Prochilodus*) possuem como características em comum corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimenta-se de detritos nos fundos lamacentos), reofilias (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e capacidade migratória durante o período de piracema. O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região neotropical, e possui 13 espécies descritas até o momento. Quanto à morfologia, os representantes desse gênero possuem lábios grossos, móveis e providos de denticulos, escamas ecnóides formando o anel etário durante a época de desova. Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimbatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimbatá. As espécies de *Prochilodus* possuem características reprodutivas em comum, tais como: desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidado parental. A espécie *P. lineatus*, conhecida popularmente como curimbatá, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil). Entre as características diagnósticas de *P. lineatus* estão: nadadeira caudal sem manchas negras, presença de linha lateral completa com 44 a 50 escamas e presença de 42 a 44 vertebras. *Prochilodus lineatus* apresenta  $2n = 54$  cromossomos com a presença de constrição secundária no braço longo do segundo par de metacêntricos, correspondendo à região organizadora de nucléolo (RON) (Silva 2006).

O *Prochilodus lineatus* tem um ótimo potencial para a piscicultura por ter um baixo custo de produção, tornando-se uma alternativa economicamente atrativa. Devido a sua importância econômica e por ter sua biologia bem conhecida e ser sensível a poluentes, esta espécie é apropriada para testes de toxicidade (Maduenho et. al 2007).

### 3 - MATERIAIS

---

Materiais utilizados:

- ⟨ Trinta indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus*, com o mesmo estágio de desenvolvimento e tamanho entre 17 e 19cm, que serão coletados no CEPTA – Instituto Chico Mendes – Pirassununga – SP – Brasil.
- ⟨ Três caixas de polietileno com capacidade de 500 litros cada;
- ⟨ Amostras de água coletadas no Lago em análise e água limpa coletada no poço artesiano, situado na UNESP – Campus de Rio Claro;
- ⟨ Dez amostras de detergentes biodegradáveis de diversas marcas;
- ⟨ Seringas, heparina, os fixadores Bowin aquoso e formol neutro, e os corantes H.E., PAS, Azul de Bromofenol, Picrossirus red, Prata Amoniacal, Feulgen, Von Kossa Leishman e o anestésico benzocaína.
- ⟨ Microscópio Leica, provido de câmera para captura de imagens.

#### 4 - MÉTODOS

---

Os animais serão divididos em três grupos de 10 indivíduos, cada grupo será colocado em uma caixa de polietileno de 500 litros. Os animais serão alimentados com a mesma ração que lhes era dada no CEPTA – Instituto Chico Mendes. O grupo controle (de ora em diante denominado de *controle*) será exposto à água clorada comprovadamente pura do poço da UNESP – Campus de Rio Claro – SP, a água clorada será usada, pois a água do campus é tratada com este elemento para eliminar as possíveis contaminações da mesma, sendo que a água clorada é a única disponível para o experimento; entretanto a água que será utilizada será oxigenada por uma semana antes do experimento para tentar baixar os níveis do cloro. O segundo grupo será exposto à água do Lago Azul, Rio Claro – SP – Brasil, (de ora em diante denominado de *Lago Azul*), e o terceiro a uma diluição na proporção de 1:1000000 de uma mistura de diversas marcas de detergentes biodegradáveis (de ora em diante denominado *detergente*). Poucos estudos abordam os valores de toxicidade dos detergentes biodegradáveis, segundo Roy (1988) a DL50 para diversos grupos de peixes varia entre 7ppm e 22,5ppm. Isto posto este estudo utilizará uma diluição de 1ppm, pois visa detectar alterações histológicas já com níveis baixíssimos de agente poluentes, tendo em vista que as diluições de detergentes em rios, não deve exceder este valor, uma vez que com níveis mais altos, como se é esperado as alterações ocorrem. Os materiais a serem analisados serão coletados após os períodos de exposição de uma semana e de vinte dias; a coleta em uma semana de exposição será feita devido aos resultados de um projeto piloto realizado com esta mesma finalidade e cujos resultados mostraram que alterações principalmente no número de células sanguíneas já são observadas. O sangue dos animais será coletado por punção da veia caudal, com seringas contendo heparina e corado com o corante de Leishman, sendo que as células serão contadas em 10 campos escolhidos aleatoriamente em toda a extensão da lâmina. Antes de serem sacrificados para a coleta dos órgãos a serem analisados, os animais serão anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1 mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada), para amenizar sofrimento dos indivíduos durante o processo de dissecação. As brânquias e o fígado serão fixados em Bouin aquoso e preparados para técnica de

historesina com reações em H.E., PAS, Azul de Bromofenol, Picosirus Red, Prata Amoniacal e Feulgen, e fixada em formol neutro para técnica de Von Kossa. As técnicas histoquímicas, bem como os fixadores a serem usados, estão descritos nos itens seguintes.

#### **4.1 – Técnicas Histoquímicas**

##### **Hematoxilina e Eosina (HE):**

Segundo Paulete & Beçak (1976) esta técnica é composta dos reagentes Hematoxilina, que possui características basófilas e cora o núcleo celular de azul, e Eosina, que possui características acidófilas e cora o citoplasma da célula de rosa. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Deixar as lâminas em água destilada por 1 min.
- Corar com hematoxilina por 5min.
- Reagir com água por 4min.
- Lavar em água corrente.
- Corar com eosina por 5min.
- Lavar as lâminas em água corrente.

##### **PAS (Ácido Periódico de Schiff)**

Segundo Paulete & Beçak (1976) o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar a formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Reagir o material com ácido periódico 0,4% por 10min.
- Lavar em água destilada.
- Reagir com o reativo de Schiff por 1h no escuro
- Lavar em água sulfurosa (3 banhos de 1min. cada)
- Lavar em água corrente por 10min.

\* As regiões em que existem glucídios ficam vermelhos arroxeados.

### **Azul de Bromofenol**

Segundo Behmer et al (2003) esta técnica é usada para a detecção de proteínas, corando principalmente em pH de 3,0 a 4,6, cujos resultados são observados principalmente nas cores azul e amarela. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Corar por 1h a temperatura ambiente.
- Lavar em ácido acético 0,5% por 1min.
- Lavar em água corrente por 5min.
- Passar em álcool butílico terciário.

### **Picrosirius Red**

Segundo Pearse (1985) esta técnica é usada para diferenciar fibras de colágeno do tipo I e III. O colágeno do tipo I é evidenciado pela coloração vermelha e o colágeno do tipo III é corado de verde. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Corar com Picrosirius por 1h em estufa a 60°C, com o corante a mesma temperatura.
- Lavar em água destilada.
- Corar com hematoxilina por 8min.
- Lavar em água corrente.

### **Prata Amoniacal**

Segundo Paulete & Beçak (1976) esta técnica precipita a prata em estado de carbonato, por meio de carbonato alcalino, redissolvendo-se posteriormente o precipitado com amônia. A redução é feita com formol neutro. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Tratar com permanganato de potássio por 5min.
- Lavar rapidamente com água corrente.
- Descorar pela solução de ácido oxálico.
- Lavar em água destilada por 2min.
- Tratar com prata amoniacal aquecida a 60°C por 15min.
- Lavar em água destilada por 2min.
- Tratar em formalina aquecida a 60°C por 2min.
- Lavar rapidamente com água destilada.
- tratar com cloreto de ouro por 2min.

- Lavar rapidamente com água destilada.
- Tratar com hipossulfito de sódio por 2min.
- \* Núcleos em preto e fundo branco.

### **Feulgen**

Segundo Paulete & Beçak (1976) este método baseia-se no fato de que o ácido clorídrico quebra a ligação purina desoxirribose formando grupamentos aldeídicos na desoxirribose. Os grupamentos aldeídos são evidenciados pelo reagente de Schiff. A hidrólise feita pelo ácido não afeta o RNA, de modo que o método é específico para DNA. O reagente de Schiff reage com os grupamentos aldeídos e forma um novo composto insolúvel e de cor vermelho forte. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Hidrolisar os cortes no ácido clorídrico 1N, pré aquecido a 60°C durante 8min.
- Transferir para solução de schiff durante 45min.
- Lavar os cortes por três vezes em solução de metabissulfeto por 2min. cada vez.
- Lavar em água destilada.
- \* O DNA nuclear será corado de vermelho.

### **Von Kossa**

Segundo Paulete & Beçak (1976) este método depende da presença de fosfato e carbonato. Em tecidos animais, entretanto fosfatos insolúveis e carbonatos estão sempre perto do cálcio, com isso este teste é suficientemente específico para este elemento. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Corar por 20min. com nitrato de prata.
- Lavar rapidamente em água.
- Revelar com D-72 por 1min.
- Tratar com tiosulfato 5% por 30min.
- Lavar em água destilada.
- Contracorar com hematoxilina por 6min.
- Lavar em água corrente.

### **Leishman**

Segundo Paulete & Beçak (1976) este corante é usado para coloração de esfregaço de sangue. Ele evidencia o núcleo de cor vermelho-azulado, os grânulos acidófilos de rosa ou vermelho, os grânulos basófilos de azul e as hemácias de rosa – salmão. Os procedimentos da técnica seguem abaixo:

- Esfregaços secos são corados sem fixar, por 1min. com 5 a 10 gotas do corante.
- Adicionar o dobro de quantidade de água destilada (10 a 20 gotas), misturando a solução com um leve balançar da lâmina.
- Deixar corar por 5 a 10 min.
- Despejar o corante e lavar com água destilada.
- Cobrir a lâmina com água destilada por 1min.
- Despejar a água e secar a lâmina.

## **4.2 – Fixadores**

### **Bouin**

Segundo Paulete & Beçak (1976):

750 ml de solução saturada de ácido pícrico.

50 ml de ácido acético glacial.

Ácido pícrico em solução saturada aquosa. Dissolver 1,5g de ácido pícrico em 100mL de água destilada quente. Agitar, filtrar no dia seguinte.

### **Formol Neutro**

Segundo Paulete & Beçak (1976):

100 mL de Formalina (formaldeído a 40%).

900 mL de água destilada.

1 barra de carbonato de cálcio.

Prepara-se o formol habitual, mas acrescenta-se no recipiente que o contém 2 ou 3 pedaços da barra de carbonato de cálcio.

---

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 – Análises do sangue

As lâminas de sangue coradas com Leishman evidenciaram claramente quatro grupos de células: os eritrócitos (Figura 1 - setas), apresentando morfologia oval, com uma coloração rósea do citoplasma e seus núcleos corados de azul; eritroblastos (Figura 2 - seta), células maiores do que os eritrócitos, entretanto com a mesma coloração apresentada pelo seu estágio maduro; leucócitos (Figura 3 - setas), células com núcleos grandes, geralmente irregulares em tons de vermelho e citoplasma em tons de azul ou vermelho e, em alguns casos, com aspecto granular e trombócitos (Figura 4 - setas), cujos núcleos apresentam tamanho muito semelhante ao dos eritrócitos, porém possuem formas redondas ou em bastões, com coloração azul escuro – roxo e com citoplasma escasso.

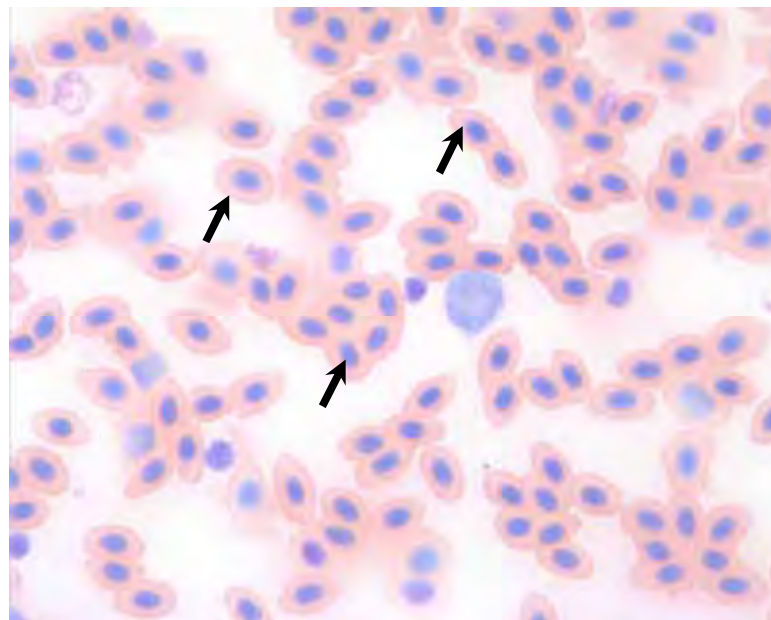


Figura 1: As setas indicam eritrócitos corados com Leishman (600X).

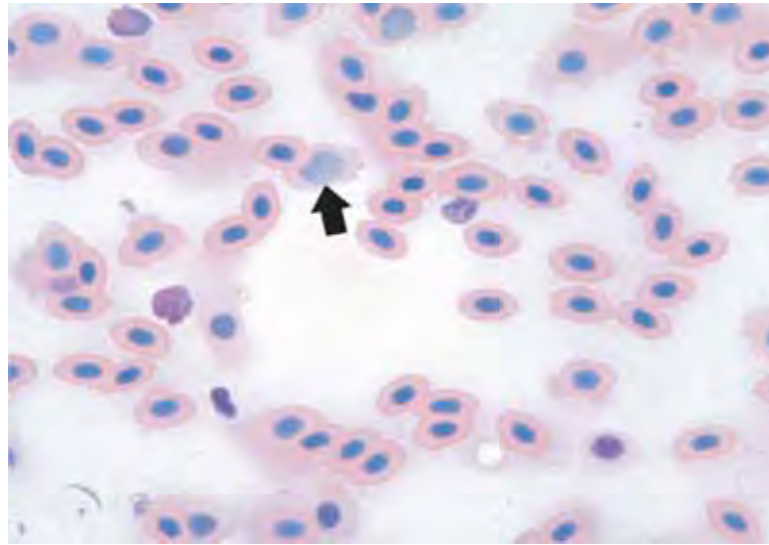


Figura 2: A seta indica um eritroblasto corado com Leishman (800X).

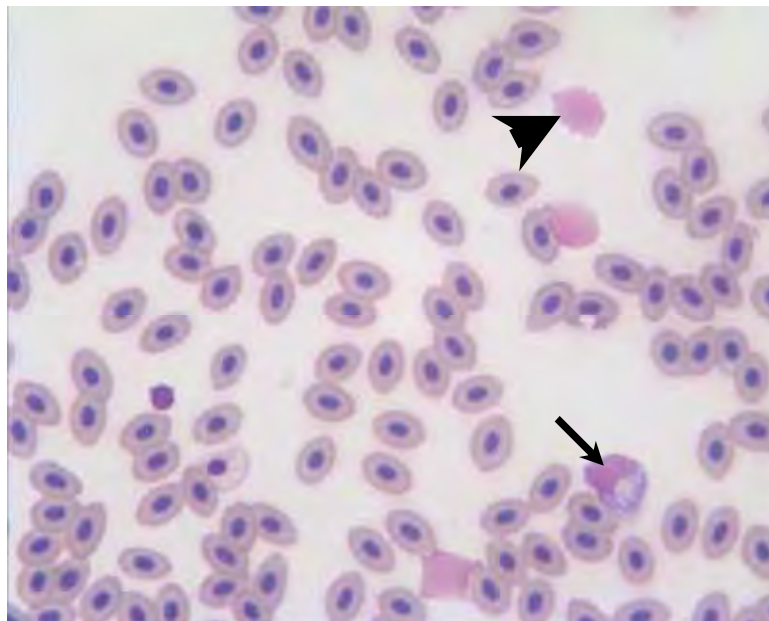


Figura 3: A seta preta indica um leucócito com núcleo e citoplasma evidentes, a cabeça de seta indica um leucócito com apenas o citoplasma evidente (800X).

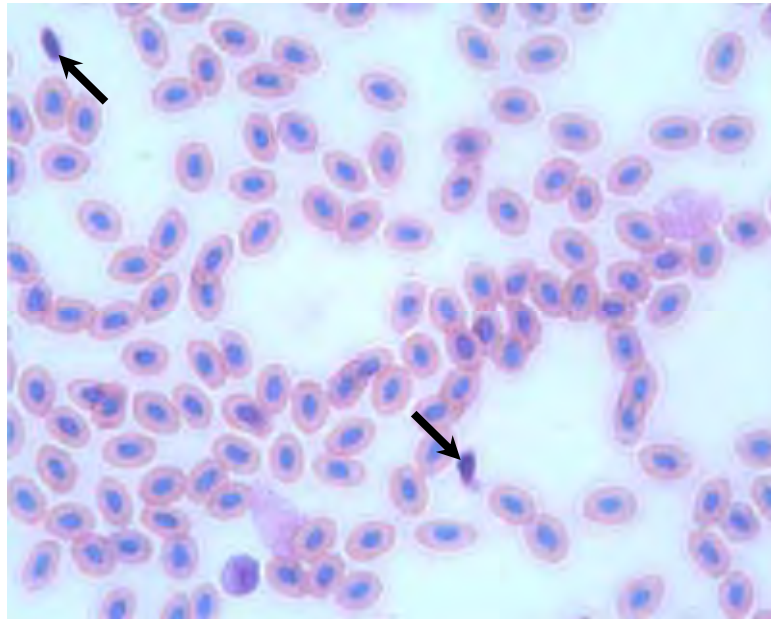


Figura 4: As setas indicam trombócitos corados por Leishman (800X)

Por meio da coloração de Leishman foi possível a identificação de alguns leucócitos, sendo encontrados principalmente linfócitos (Figura 5), neutrófilos (Figura 6), monócitos (Figuras 6 e 7) e células granulocítica especial ou leucócito granular PAS-positivo (Figura 8).

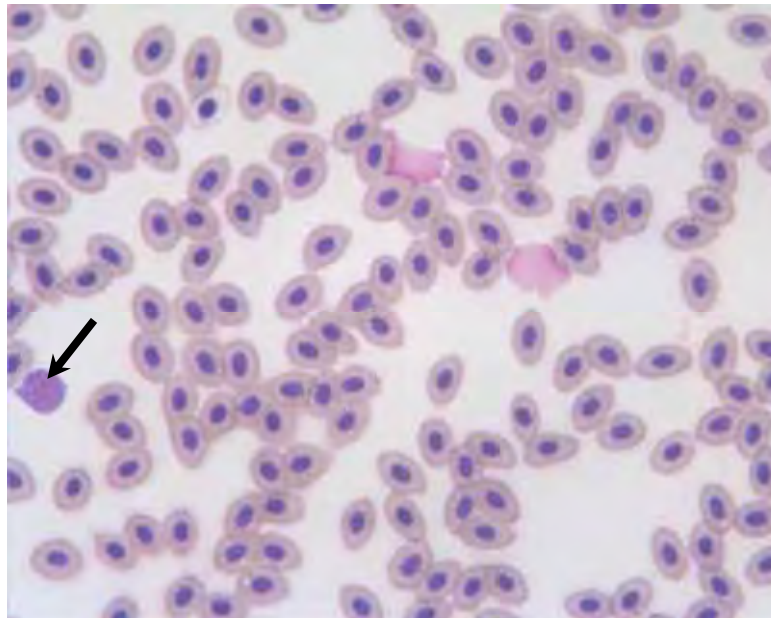


Figura 5: A seta indica um linfócito (800X)

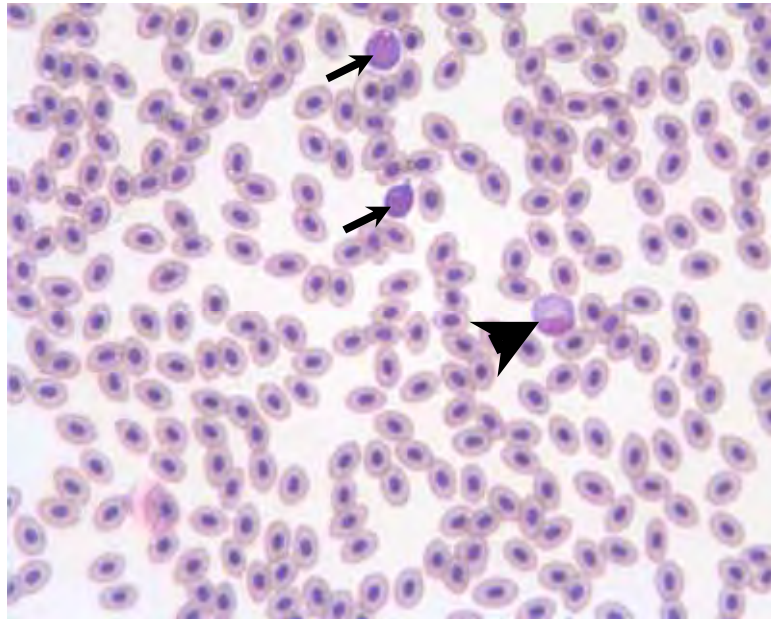


Figura 6: As setas pretas indicam neutrófilos e a cabeça de seta indica um monócito (600X)

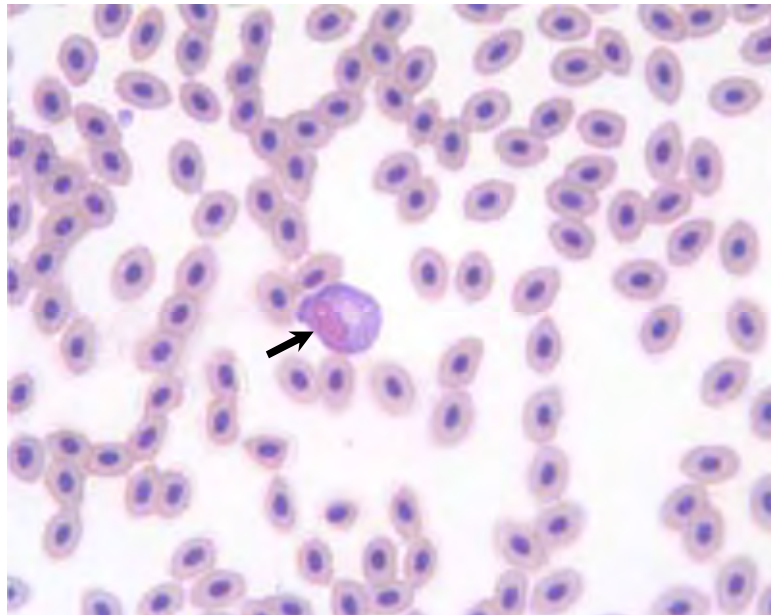


Figura 7: A seta mostra um monócito (800X)

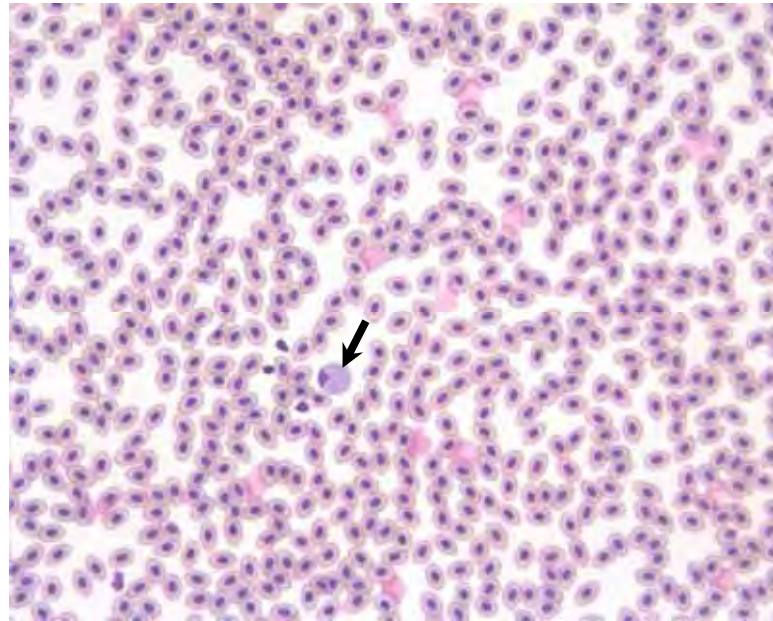


Figura 8: A seta indica uma célula granulócítica especial ou leucócito granular PAS-positivo (400X)

Para a análise dos efeitos dos agentes contaminantes no número de células brancas no sangue dos indivíduos em estudo, foi escolhido o método de contagem indireta, pois segundo Ishikawa et. al (2008) a metodologia de contagem direta em peixes não é recomendada, pois a diferenciação principalmente entre trombócitos leucócitos e eritrócitos é dificultada na câmara de Neubauer. As contagens foram feitas 10 em campos escolhidos aleatoriamente, percorrendo-se toda a extensão das lâminas, utilizando-se o aumento de 400x. Foram feitas contagens diferenciais entre leucócitos, trombócitos e uma contagem total, com a somatória destes dois grupos de células juntas, pois segundo Tavares-Dias e Moraes (2004), tanto leucócitos como trombócitos são consideradas células de defesa, sendo incluídas no grupo de células brancas; apesar de possuírem características diferentes quanto ao modo de ação. Os trombócitos são células que previnem infecções e atuam na coagulação do sangue enquanto os leucócitos atuam mais diretamente contra os antígenos. Tendo isso em mente esta contagem diferencial foi realizada, na tentativa de evidenciar não só os efeitos dos contaminantes sobre o número de glóbulos brancos totais como tanto no número de leucócitos e trombócitos separadamente, com o intuito de correlacionar os efeitos dos poluentes com as atividades específicas destes grupos de células.

A partir dos dados obtidos por meio da contagem de células de cada indivíduo dos grupos em estudo, foi feita a média de células encontradas por campo de cada indivíduo. Assim produziu-se, com estes dados, tabelas referentes a cada grupo, sendo que as linhas representam a média de leucócitos, trombócitos e o total de um único indivíduo. As tabelas 1, 2 e 3 apresentam os dados respectivamente dos grupos *controle*, *detergente* e *Lago Azul*, após sete dias de experimento; as tabelas 4, 5 e 6 representam os dados respectivamente dos grupos *controle*, *detergente* e *Lago Azul*, após vinte dias de experimento (as tabelas de dados de vinte dias apresentam apenas 8 indivíduos, pois foram sacrificados espécimes por grupo para análise histológica do fígado e brânquias, procedimento também realizado vinte dias). As tabelas 7 e 8 e os gráficos 1 e 2 apresentam a comparação entre *controle*, *detergente* e *Lago Azul*, quanto ao número de leucócitos, durante o experimento. As tabelas 9 e 10 e os gráficos 3 e 4 representam esta mesma comparação entre grupos, levando em consideração o número de trombócitos.

Tabela 1: Médias da contagem diferencial, em 10 campos, de células sanguíneas realizadas no aumento de 400x, no *controle* após 7 dias de experimento.

	Leucócitos	Trombócitos	Total
Espécime 1	2,6	2,1	4,7
Espécime 2	1,4	3,3	4,7
Espécime 3	4,2	2,1	6,3
Espécime 4	3,1	12,1	15,2
Espécime 5	4,2	1,5	5,7
Espécime 6	2,2	3,6	5,8
Espécime 7	0,3	3	3,3
Espécime 8	3,3	8,8	12,1
Espécime 9	0,7	2,7	3,4
Espécime 10	2,6	1,1	3,7

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime.

Tabela 2: Médias da contagem diferencial, em 10 campos, de células sanguíneas realizadas no aumento de 400x, no grupo *detergente* após 7 dias de experimento.

	Leucócitos	Trombócitos	Total
Espécime 1	3,4	3,2	6,6
Espécime 2	2,4	1,9	4,3
Espécime 3	1,8	2,3	4,1
Espécime 4	3,4	1,1	4,5
Espécime 5	2,3	3	2,6
Espécime 6	3,3	2,5	5,8
Espécime 7	1,5	1,1	2,6
Espécime 8	1,7	2,4	4,1
Espécime 9	3	1,5	4,5
Espécime 10	2,4	2	2,6

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime.

Tabela 3: Médias da contagem diferencial, em 10 campos, de células sanguíneas realizadas no aumento de 400x, no grupo *Lago Azul* após 7 dias de experimento.

	Leucócitos	Trombócitos	Total
Espécime 1	18,3	4,5	22,8
Espécime 2	19,6	5,5	25,1
Espécime 3	20,5	9	28,5
Espécime 4	18,6	7,2	25,8
Espécime 5	19,2	1,8	21
Espécime 6	23,3	8,7	32
Espécime 7	19,5	3,9	23,4
Espécime 8	20	7,4	27,4
Espécime 9	18,9	6,8	25,7
Espécime 10	21,6	8	29,6

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime.

Tabela 4: Médias da contagem diferencial, em 10 campos, de células sanguíneas realizadas no aumento de 400x, no grupo *controle* após 20 dias de experimento.

	Leucócitos	Trombócitos	Total
Espécime 1	2	4,6	6,6
Espécime 2	1,7	16,6	18,3
Espécime 3	1,2	7,8	9
Espécime 4	0,6	3,5	4,1
Espécime 5	1,4	8,4	9,8
Espécime 6	1,1	6	7,1
Espécime 7	1,3	0,9	2,2
Espécime 8	1,4	10,5	11,9

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime.

Tabela 5: Médias da contagem diferencial, em 10 campos, de células sanguíneas realizadas no aumento de 400x, no grupo *detergente* após 20 dias de experimento.

	Leucócitos	Trombócitos	Total
Espécime 1	1,5	0,2	1,7
Espécime 2	2	1,4	3,4
Espécime 3	1,2	3,2	4,4
Espécime 4	1,5	5,2	6,7
Espécime 5	2,4	0,1	2,5
Espécime 6	1,2	2,4	3,6
Espécime 7	1,1	4,5	5,6
Espécime 8	1,4	0,6	2

⟨ Cada linha representa a média de células encontradas um espécime.

⟨

Tabela 6: Médias da contagem diferencial, em 10 campos, de células sanguíneas realizadas no aumento de 400x, no grupo *Lago Azul* após 20 dias de experimento.

	Leucócitos	Trombócitos	Total
Espécime 1	19,1	2,3	21,4
Espécime 2	25	6	31
Espécime 3	25	4,4	29,4
Espécime 4	27,8	3,2	31
Espécime 5	19,4	8,6	28
Espécime 6	24,9	7,1	32
Espécime 7	26,1	5,9	32
Espécime 8	18,2	6	24,2

⟨ Cada linha representa a média de células encontradas um espécime.

⟨

Tabela 7: Comparação entre o número de leucócitos, contados em 10 campos, dos grupos *controle, detergente e Lago Azul*, após 7 dias de experimento

	<i>CONTROLE</i>	<i>DETERGENTE</i>	<i>LAGO AZUL</i>
Espécime 1	2,6	3,4	18,3
Espécime 2	1,4	2,4	19,6
Espécime 3	4,2	1,8	20,5
Espécime 4	3,1	3,4	18,6
Espécime 5	4,2	2,3	19,2
Espécime 6	2,2	3,3	23,3
Espécime 7	0,3	1,5	19,5
Espécime 8	3,3	1,7	20
Espécime 9	0,7	3	18,9
Espécime 10	2,6	2,4	21,6

⟨ Cada linha representa a média de células encontradas um espécime

Tabela 8: Comparação entre o número de leucócitos, contados em 10 campos, dos grupos *controle, detergente e Lago Azul*, após 20 dias de experimento.

	<i>CONTROLE</i>	<i>DETERGENTE</i>	<i>LAGO AZUL</i>
Espécime 1	2	1,5	19,1
Espécime 2	1,7	2	25
Espécime 3	1,2	1,2	25
Espécime 4	0,6	1,5	27,8
Espécime 5	1,4	2,4	19,4
Espécime 6	1,1	1,2	24,9
Espécime 7	1,3	1,1	26,1
Espécime 8	1,4	1,4	18,2

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime

Tabela 9: Comparação entre o número de trombócitos, contados em 10 campos, dos grupos *controle, detergente e Lago Azul*, após 7 dias de experimento.

	<i>CONTROLE</i>	<i>DETERGENTE</i>	<i>LAGO AZUL</i>
Espécime 1	2,1	3,2	4,5
Espécime 2	3,3	1,9	5,5
Espécime 3	2,1	2,3	9
Espécime 4	12,1	1,1	7,2
Espécime 5	1,5	3	1,8
Espécime 6	3,6	2,5	8,7
Espécime 7	3	1,1	3,9
Espécime 8	8,8	2,4	7,4
Espécime 9	2,7	1,5	6,8
Espécime 10	1,1	2	8

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime

Tabela 10: Comparação entre o número de trombócitos, contados em 10 campos, dos grupos *controle, detergente e Lago Azul*, após 20 dias de experimento

	<i>CONTROLE</i>	<i>DETERGENTE</i>	<i>LAGO AZUL</i>
Espécime 1	4,6	0,2	2,3
Espécime 2	16,6	1,4	6
Espécime 3	7,8	3,2	4,4
Espécime 4	3,5	5,2	3,2
Espécime 5	8,4	0,1	8,6
Espécime 6	6	2,4	7,1
Espécime 7	0,9	4,5	5,9
Espécime 8	10,5	0,6	6

\* Cada linha representa a média de células encontradas um espécime

A partir dos dados numéricos encontrados, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk a fim de testar a normalidade dos valores encontrados e aplicar o teste estatístico adequado. Os testes selecionados para esta análise foram aqueles de variância ANOVA/Tukey, para dados normais e Kruskal-Wallis/Dunn para valores não normais, utilizando-se do software BioStat 5.0.

A comparação do número de leucócitos entre os grupos no período de 7 dias evidenciou que não houve diferença significativa entre o *controle* e o *detergente*; entretanto ocorreu diferença significativa entre o grupo controle e o exposto ao detergente quando comparados com o *Lago Azul* ( $p < 0,01$ , em ambos os casos) após a aplicação do teste ANOVA/Tukey (Gráfico 1). Quanto ao número de trombócitos, ocorreu diferença significativa apenas quando comparados os grupos *detergente* e *Lago Azul* ( $p < 0,05$ ), segundo o teste Kruskal-Wallis/Dunn (Gráfico 2), no mesmo período de exposição. Quanto à análise total de células brancas o teste usado foi o de Kruskal-Wallis/Dunn (Gráfico 3), e o resultado obtido foram uma diferença significativa entre os grupos *controle* e *detergente* quando comparados com o grupo *Lago Azul* ( $p < 0,05$ , em ambos os casos). Quanto às análises feitas no período de 20 dias de experimento, o número de leucócitos apresentou diferença significativa entre o grupo controle e o detergente, quando comparados com o grupo exposto ao Lago Azul ( $p < 0,05$ , em ambos os casos), após o uso do teste Kruskal-Wallis/Dunn (Gráfico 4). Para a análise do número de trombócitos, utilizou-se o mesmo teste (Gráfico 5), que demonstrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparados os grupos *controle* e *detergente* e a análise do total de células evidenciou diferença significativa entre o grupo *controle* e o *detergente* (Gráfico 6), quando comparados com o grupo exposto ao Lago Azul ( $p < 0,05$ , em ambos os casos).

Gráfico 1: Comparação do número de leucócitos, entre os grupos *controle* (1), *detergente* (2) e *Lago Azul* (3), após 7 dias de experimento

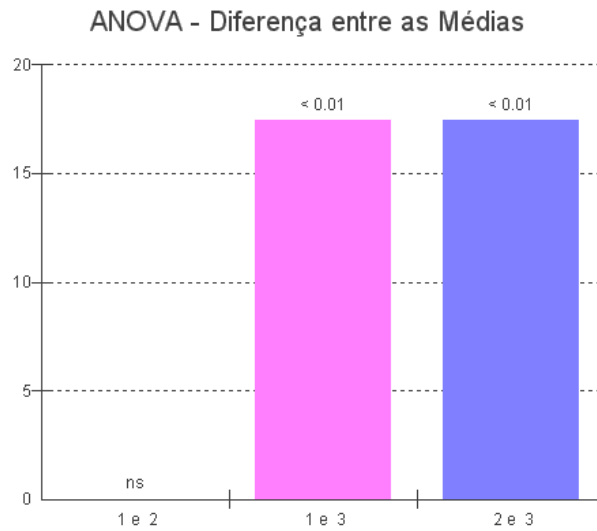


Gráfico 2: Comparação do número de trombócitos, entre os grupos *controle* (1), *detergente* (2) e *Lago Azul* (3), após 7 dias de experimento.

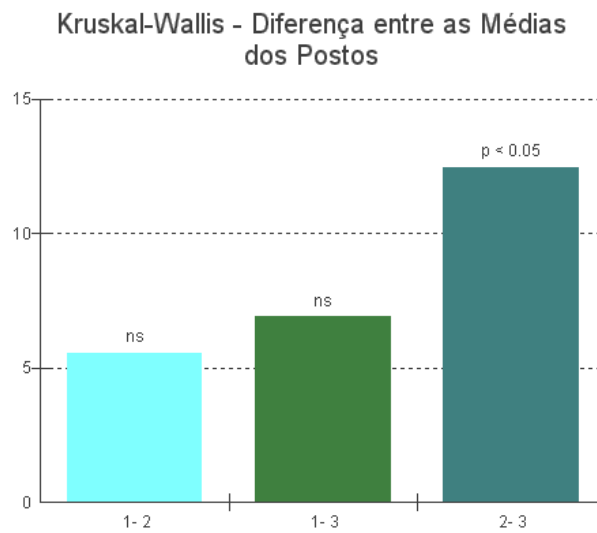


Gráfico 3: Comparação do número total de células, entre os grupos *controle* (1), *detergente* (2) e *Lago Azul* (3), após 7 dias de experimento.

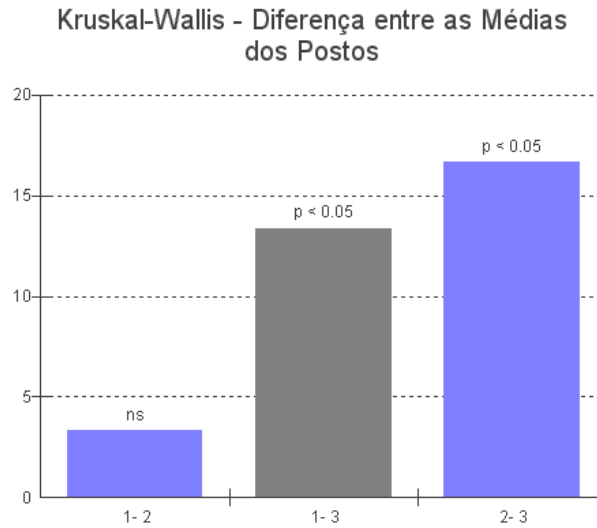


Gráfico 4: Comparação do número de leucócitos, entre os grupos *controle* (1), *detergente* (2) e *Lago Azul* (3), após 20 dias de experimento.

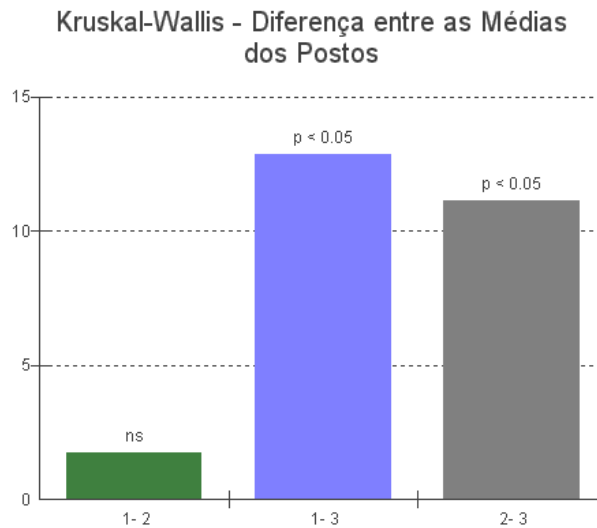


Gráfico 5: Comparação do número de trombócitos, entre os grupos *controle* (1), *detergente* (2) e *Lago Azul* (3), após 20 dias de experimento.

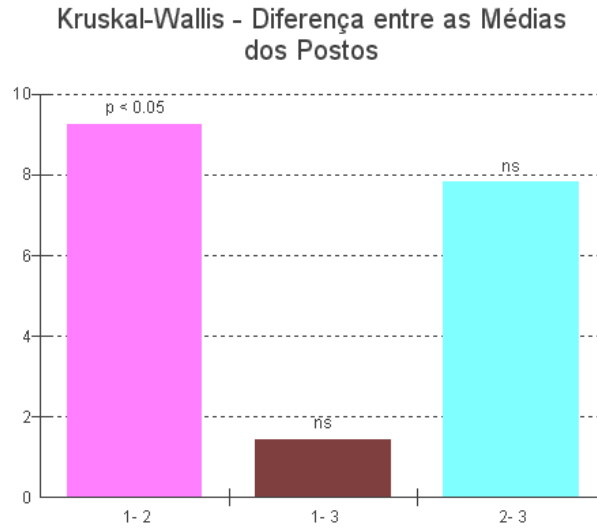
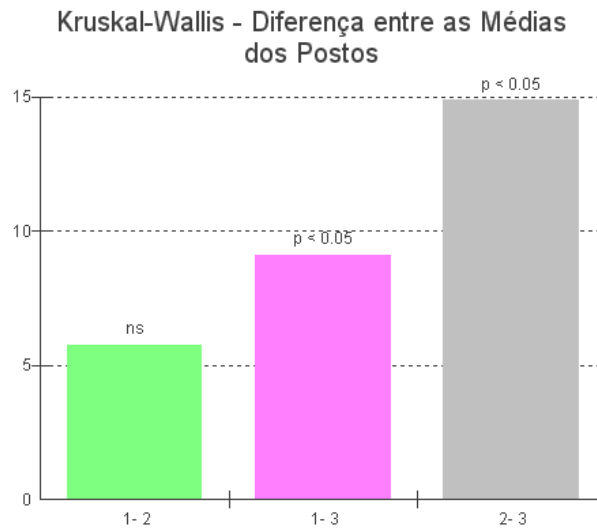


Gráfico 6: Comparação do número total de células, entre os grupos *controle* (1), *detergente* (2) e *Lago Azul* (3), após 20 dias de experimento.



Histologicamente a diferença que pode ser observada foi principalmente quanto ao número de leucócitos entre o grupo *controle* (Figuras 9 e 12) e o grupo *Lago Azul* (10 e 13), tanto no período de 7 quanto no de 20 dias de experimento, sendo que o grupo *detergente* (Figuras 11 e 14), não apresentou diferenças significativas visíveis quando comparado com o grupo *controle* em ambos os períodos de coleta.

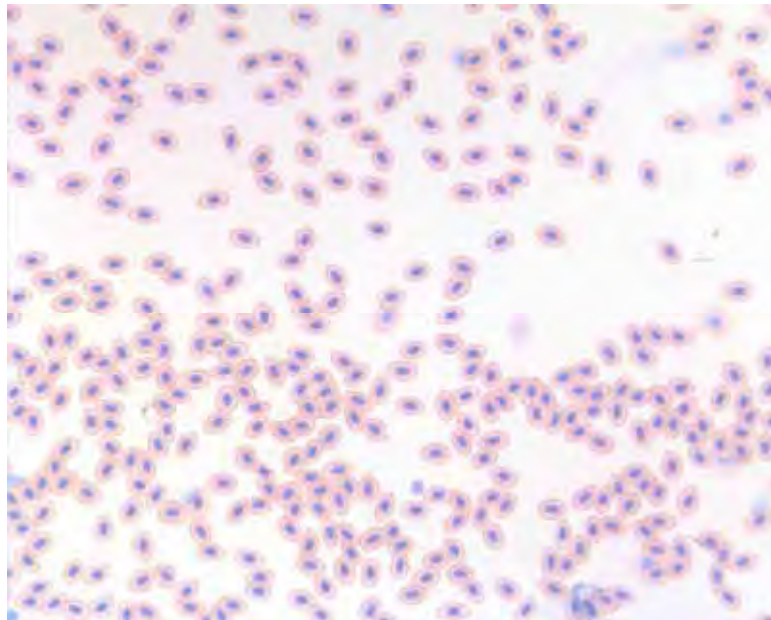


Figura 9: Vista geral do sangue do grupo *controle* após 7 dias de experimento (400X)

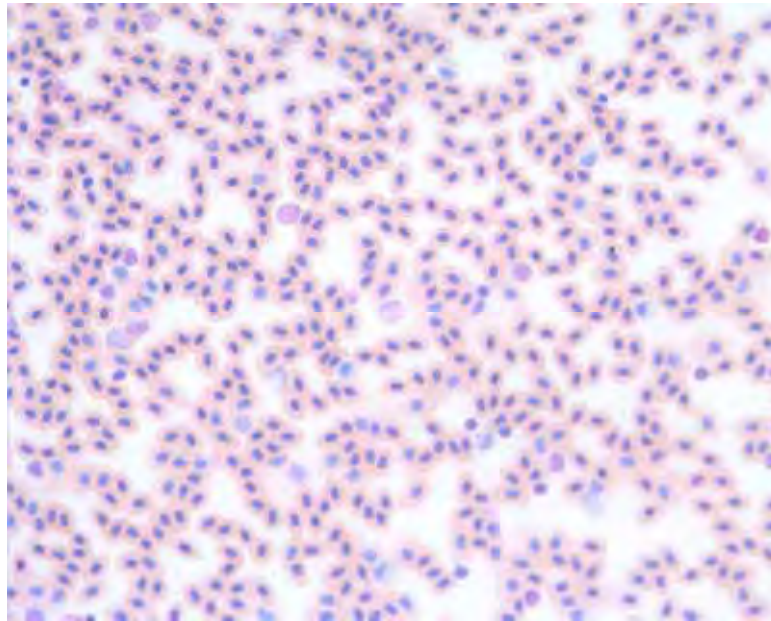


Figura 10: Vista geral do sangue do grupo *detergente* após 7 dias de experimento (400X)

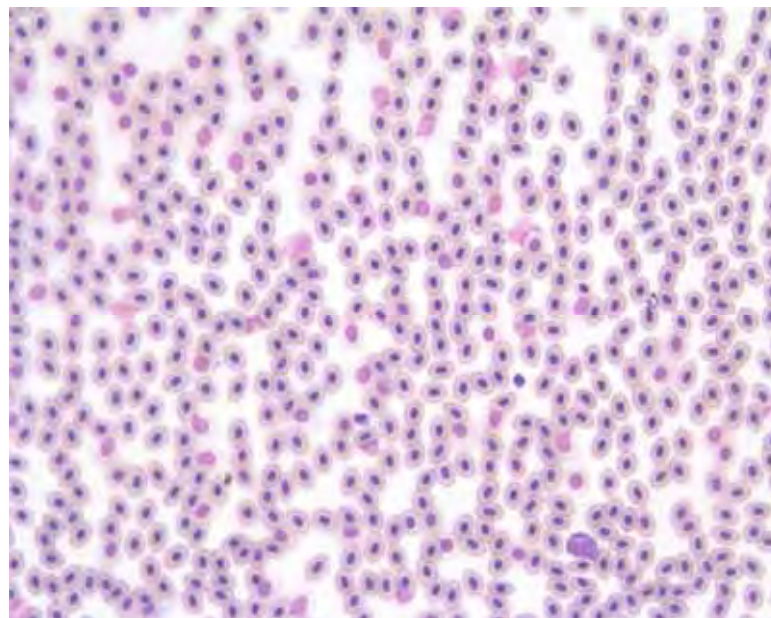


Figura 11: Vista geral do sangue do grupo *Lago Azul* após 7 dias de experimento (400X)

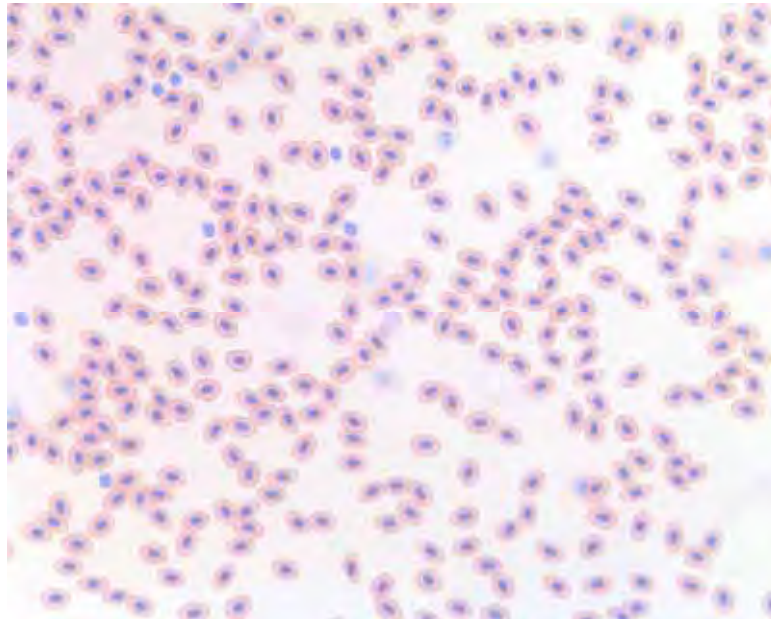


Figura 12: Vista geral do sangue do grupo *controle* após 20 dias de experimento (400X)

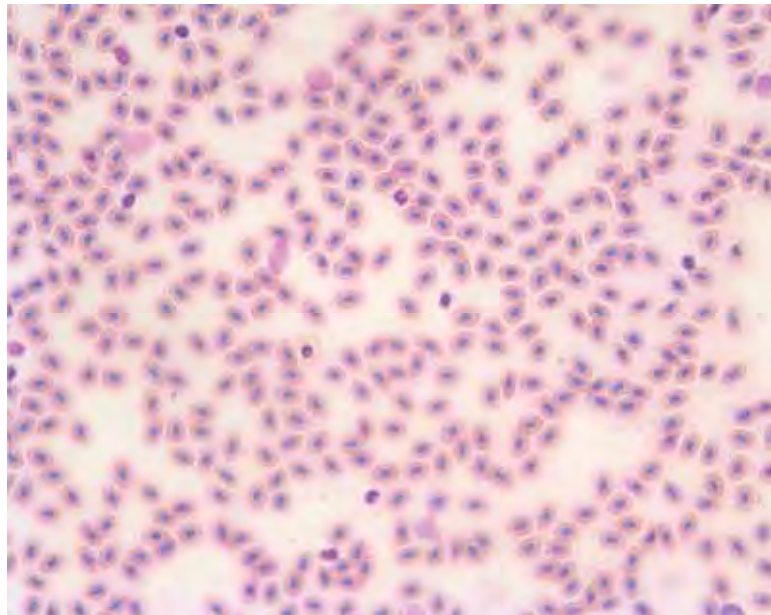


Figura 13: Vista geral do sangue do grupo *detergente* após 20 dias de experimento (400X)

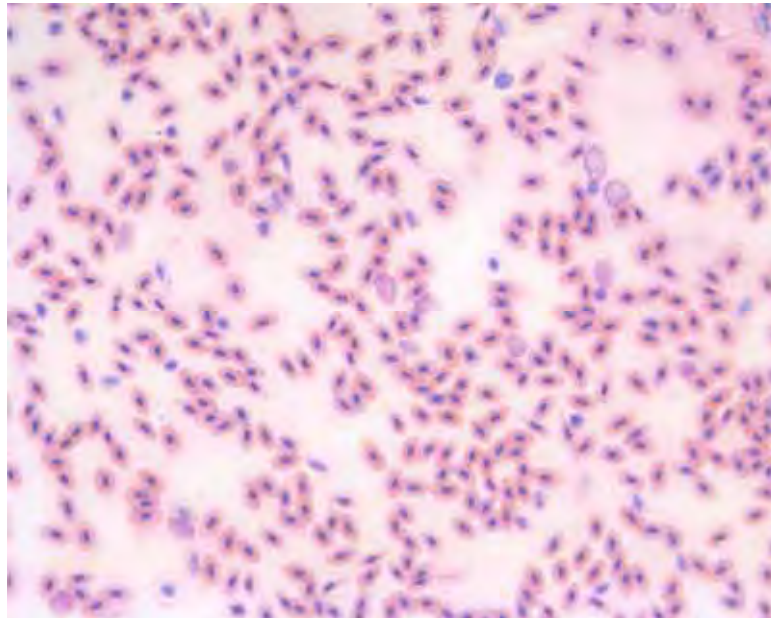


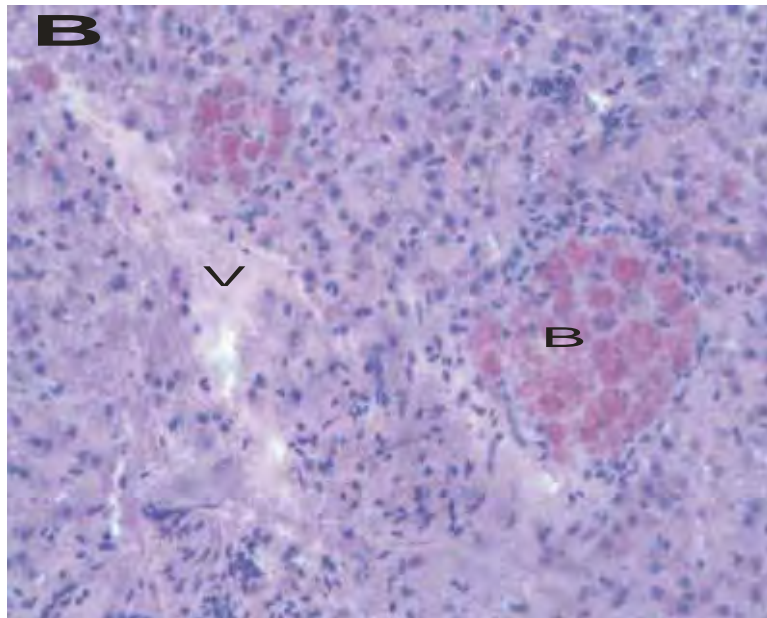
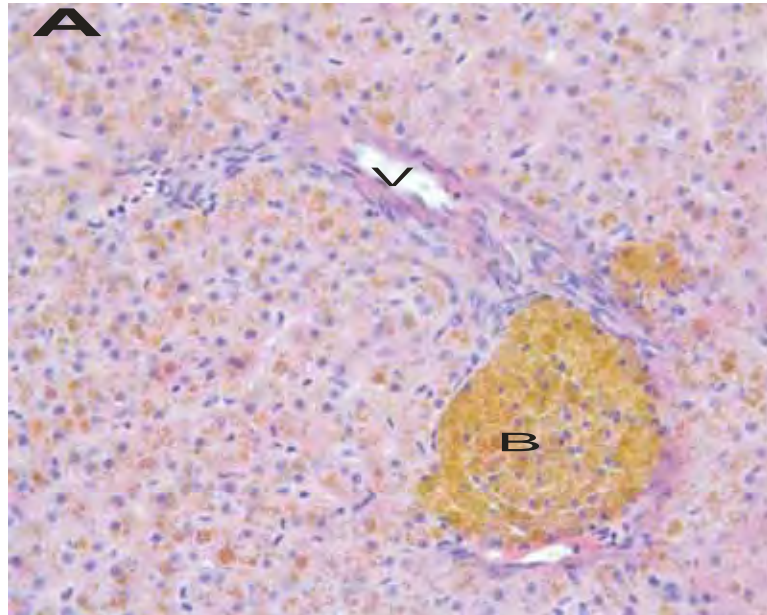
Figura 14: Vista geral do sangue do grupo *Lago Azul* após 20 dias de experimento (400X)

## 5.2 - Análise do fígado

O material coletado após sete dias de experimento revelou, através da técnica de Hematoxilina – Eosina, que o grupo *Lago Azul* apresentou vacualização dos hepatócitos, o que não foi visualizado no grupo *detergente*. Neste mesmo período de tempo observou-se diminuição na concentração de bile encontrada na luz dos vasos sanguíneos em ambos os grupos expostos a ambientes poluídos, sendo mais elevada no grupo *Lago Azul*. Estes resultados também foram obtidos na análise dos grupos após vinte dias de experimento, entretanto observou-se a vacualização do tecido hepático no grupo *detergente*, o que não havia ocorrido no início das análises (Figuras 15, 16 e 17).

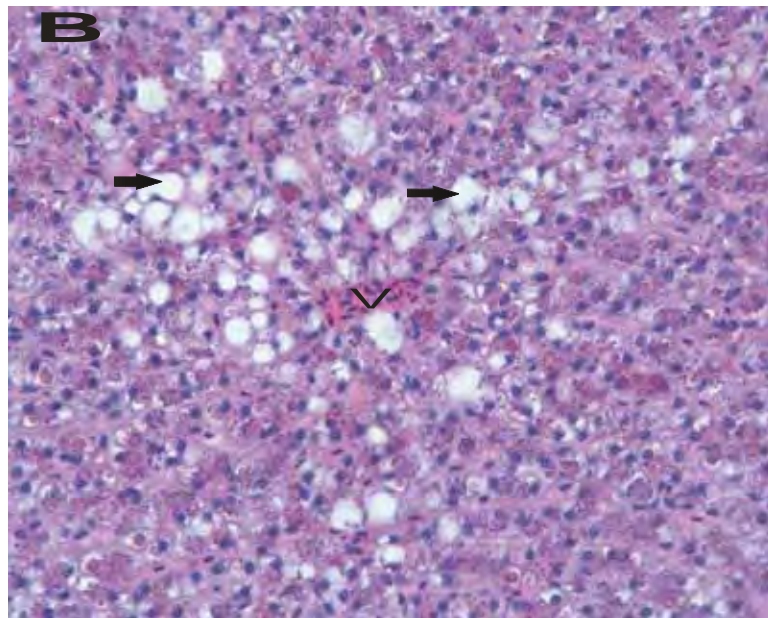
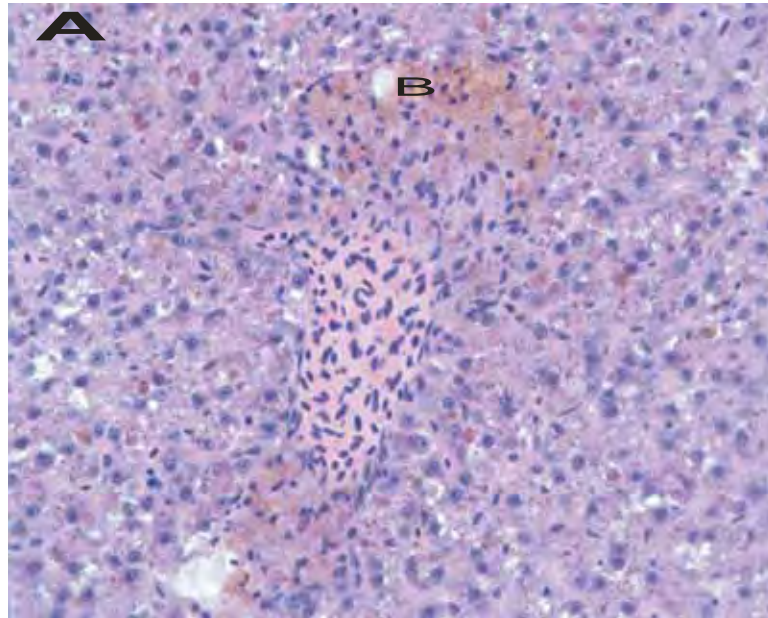
Figuras 15a e 15b:

Grupo *Controle* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de H-E



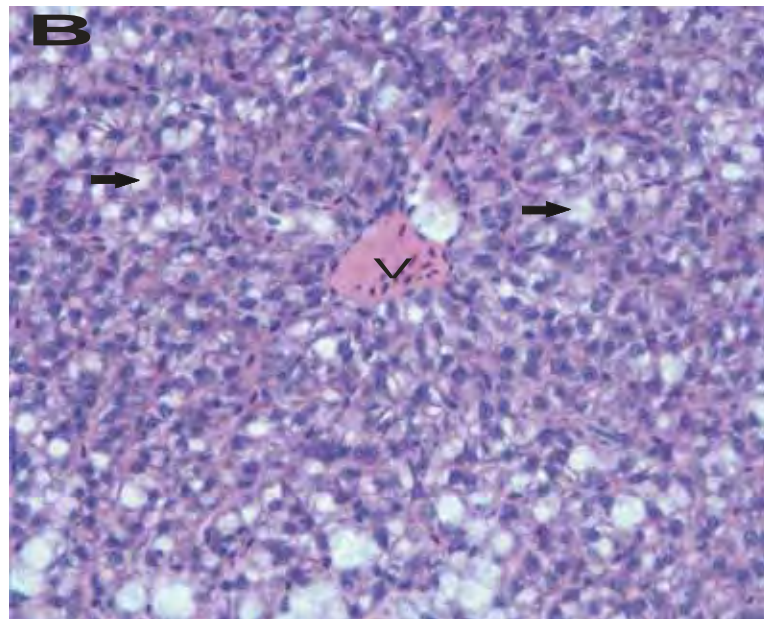
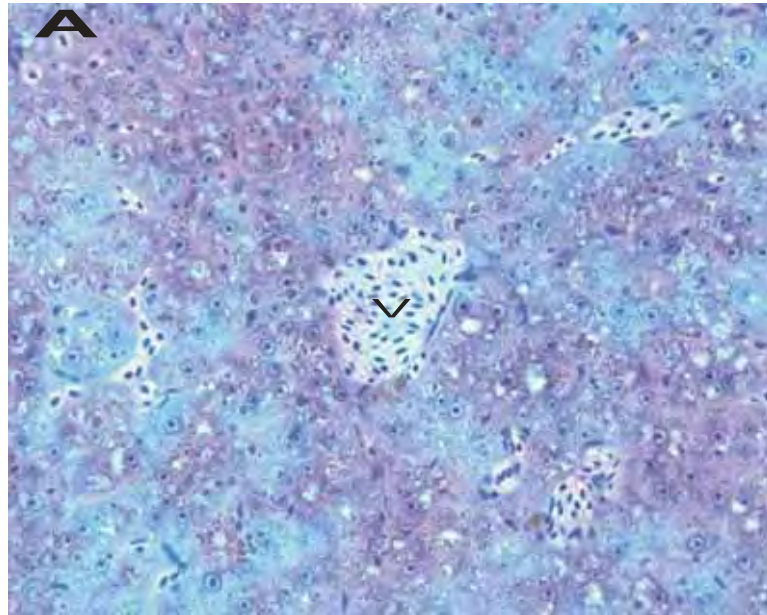
As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *controle*, no aumento de 400x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V” e acúmulos de bile indicados por “B”.

Figuras 16a e 16 b:  
Grupo *Detergente* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de H-E



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *detergente*, no aumento de 400x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V” e acúmulos de bile indicados por “B”. Observa-se a vacuolização do tecido hepático, indicada pelas setas, principalmente após vinte dias de experimento e uma diminuição dos acúmulos de bile, em comparação com o grupo controle.

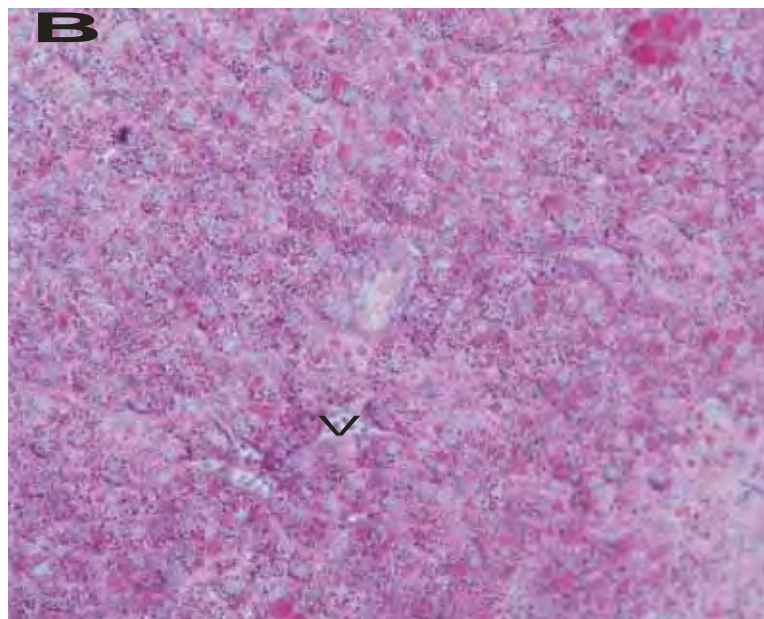
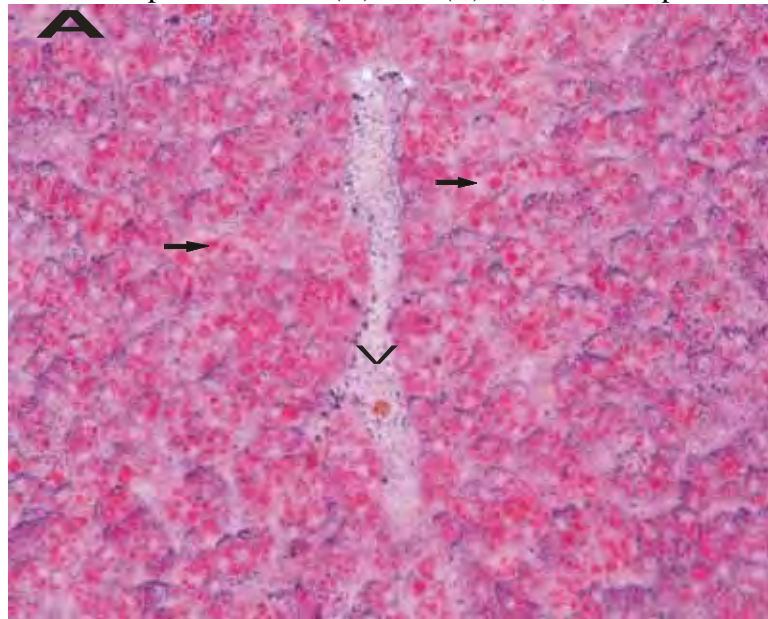
Figuras 17a e 17b:  
Grupo *Lago Azul* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de H-E



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *Lago Azul*, no aumento de 400x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”. Observa-se principalmente no período de 20 dias de experimento a vacuolização do tecido hepático, indicada pelas setas e pode-se identificar a metacromazia no período de 7 dias, que é evidenciada pela coloração azul espalhada pelo tecido.

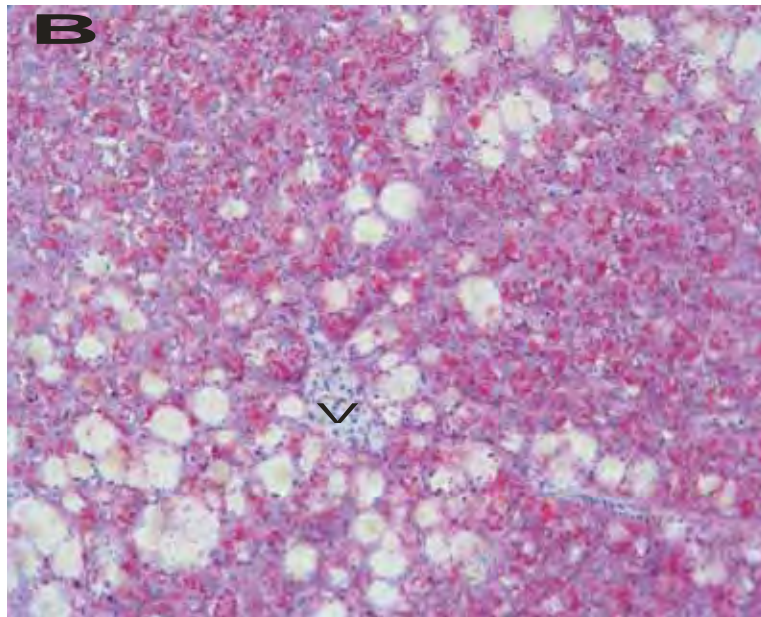
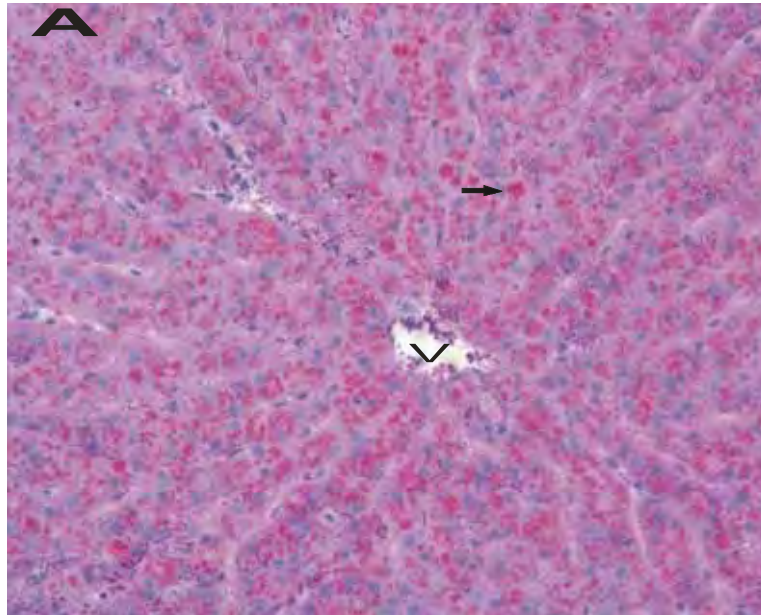
Durante a análise do material coma utilização da técnica de PAS, que visa a marcação de acúmulos de carboidratos, observou-se que tanto no período de sete dias quanto após vinte dias de experimento, ocorreu diminuição dos grânulos de glicogênio acumulados nos hepatócitos tanto no grupo *Lago Azul* quanto no grupo *detergente*. (Figura 18, 19 e 20).

Figuras 18a e 18b: Grupo *Controle* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de PAS:



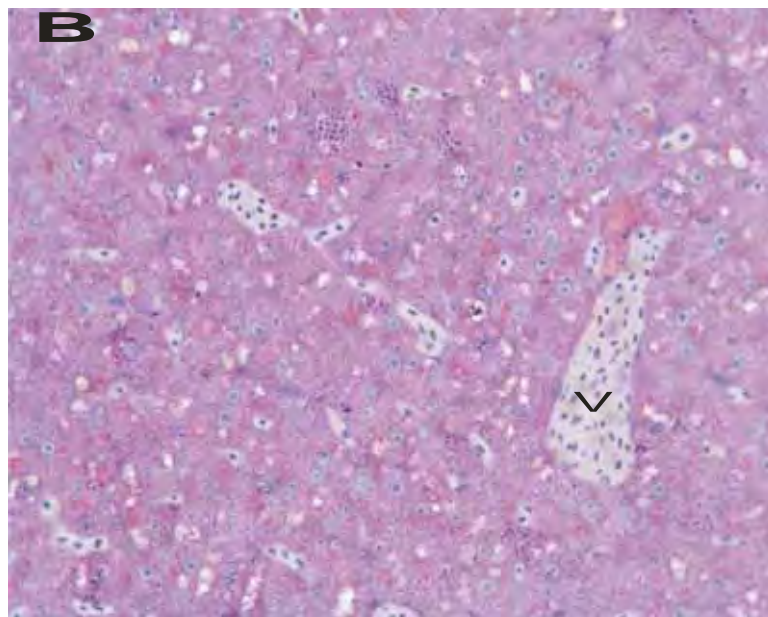
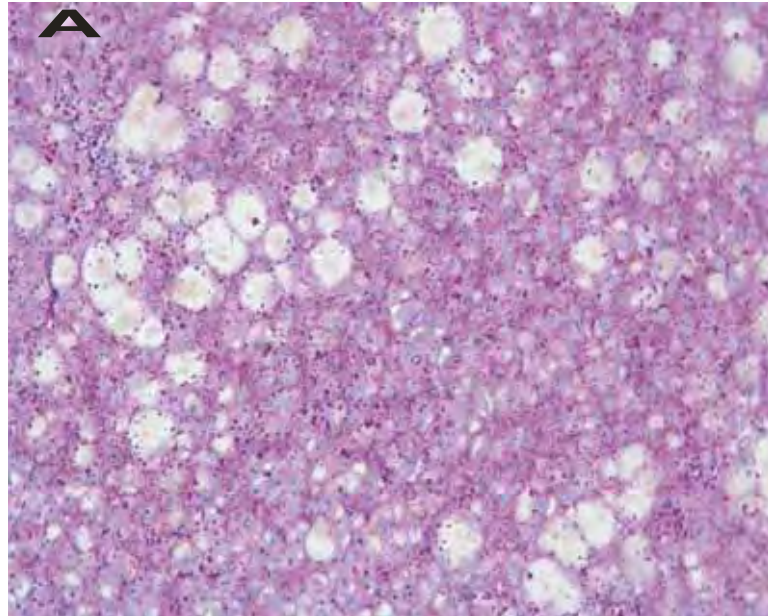
As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *controle*, no aumento de 200x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V” e acúmulos de glicogênio indicados pelas setas.

Figuras 19a e 19b  
Grupo *Detergente* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de PAS



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *detergente*, no aumento de 200x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V” e acúmulos de glicogênio indicados pelas setas. Observa-se uma diminuição na concentração de glicogênio em ambos os períodos de experimento, bem como a vacuolização do tecido após vinte dias de exposição em comparação com o grupo controle.

Figuras 20a e 20b - Grupo *Lago Azul* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de PAS

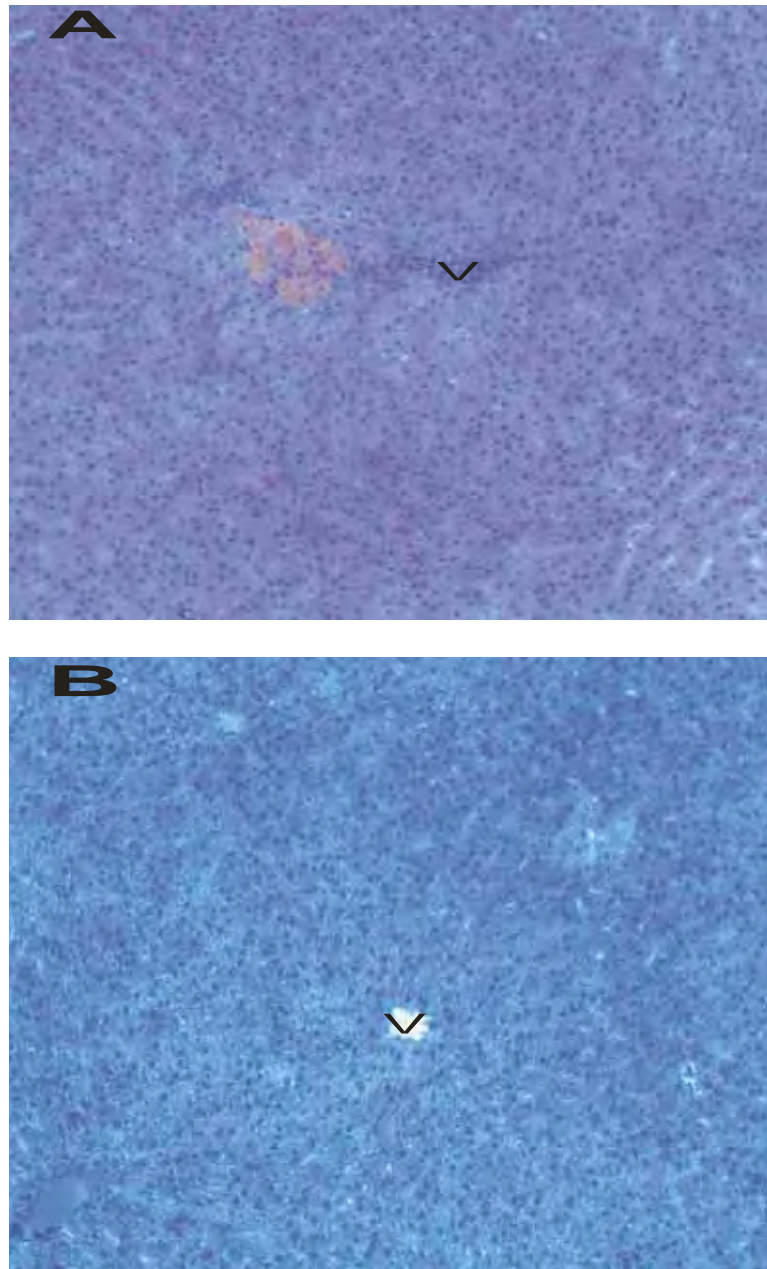


As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *Lago Azul*, no aumento de 200x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”. Observa-se uma diminuição na concentração de glicogênio em ambos os períodos de experimento, bem como a vacuolização do tecido em ambos os períodos de exposição em comparação com o grupo controle.

A técnica de Azul de Bromofenol que visa evidenciar a concentração de proteínas totais mostrou que em comparação com o grupo *controle*, o grupo *detergente* apresentou maior concentração de proteínas entorno dos vasos sanguíneos e a diminuição no restante do tecido, no

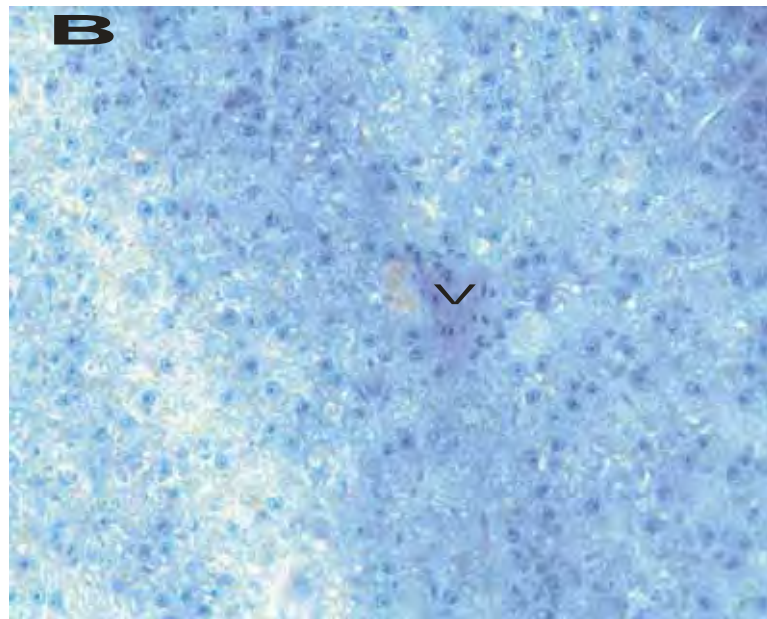
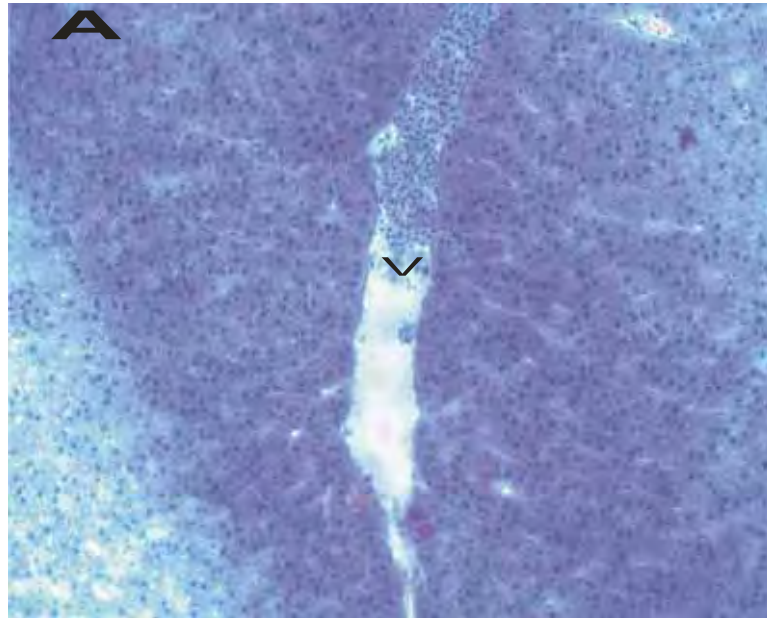
período de sete dias de experimento. No período de vinte dias deste mesmo grupo e no grupo *Lago Azul*, durante todo o experimento, observou-se a diminuição da concentração protéica em todo o tecido (Figura 21, 22 e 23).

Figuras 21a e 21b  
Grupo *Controle* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Azul de Bromofenol.



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *controle*, no aumento de 200x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”.

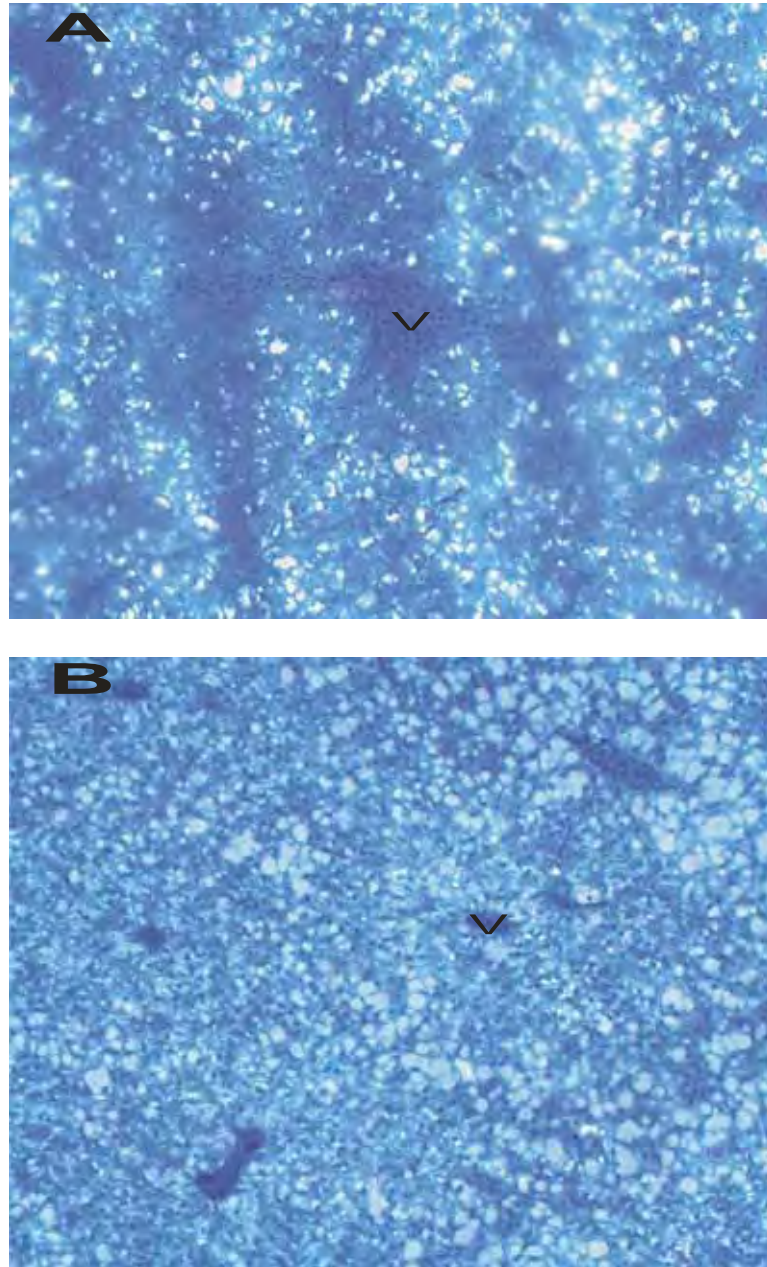
Figuras 22a e 22b  
Grupo *Detergente* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Azul de Bromofenol.



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *detergente*, no aumento de 200x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”. Observa-se uma maior concentração protéica entorno dos vasos sanguíneos em 7 dias de experimento e uma diminuição das mesmas no período de 20 dias.

Figura 23a e 23b

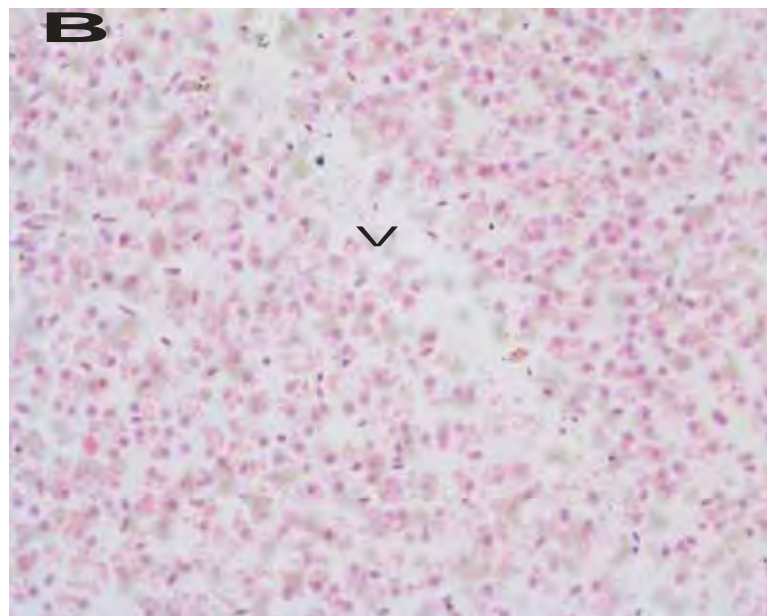
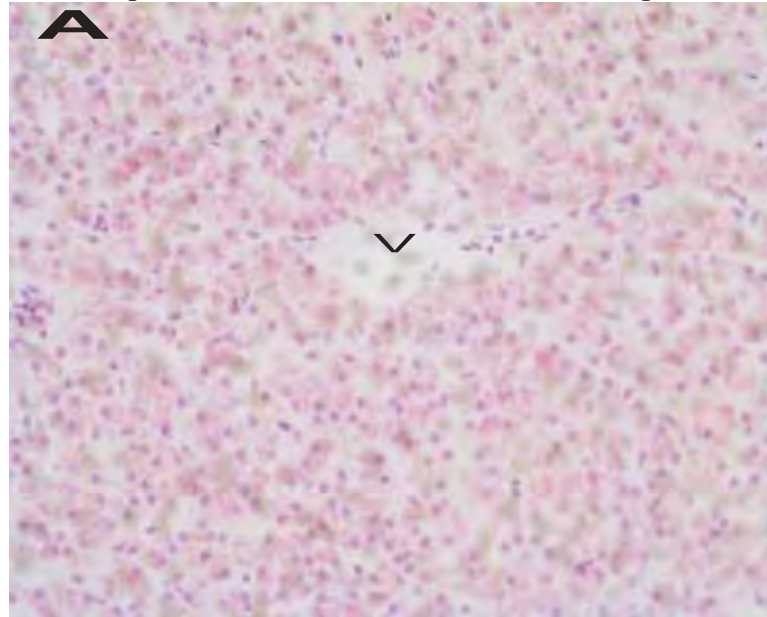
Grupo *Lago Azul* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Azul de Bromofenol.



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *detergente*, no aumento de 200x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”. Observa-se uma diminuição da concentração protéica em ambos os períodos do experimento.

Para a análise dos núcleos dos hepatócitos utilizou-se a técnica de Feulgen, a qual revelou a elevação na quantidade de núcleos deformados com material genético concentrado, característicos de células em apoptose, no grupo *detergente* após vinte dias de experimento e no grupo *Lago Azul* durante todo o experimento (Figura 24, 25 e 26).

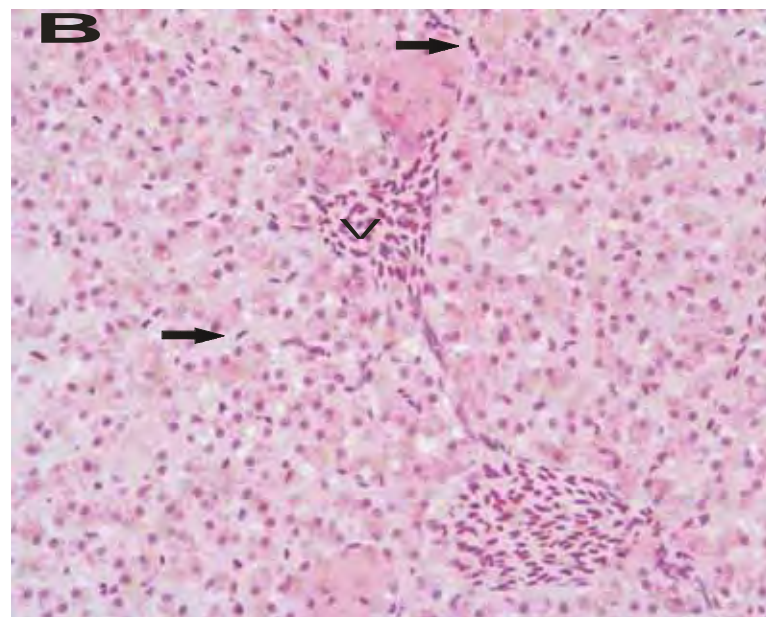
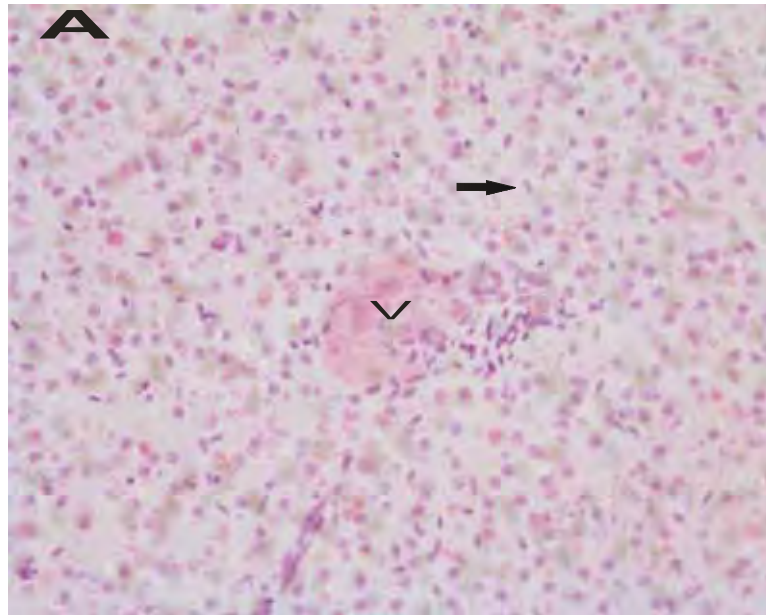
Figuras 24a e 24b - Grupo *Controle* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Feulgen.



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *controle*, no aumento de 400x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”.

Figura 25<sup>a</sup> e 25b

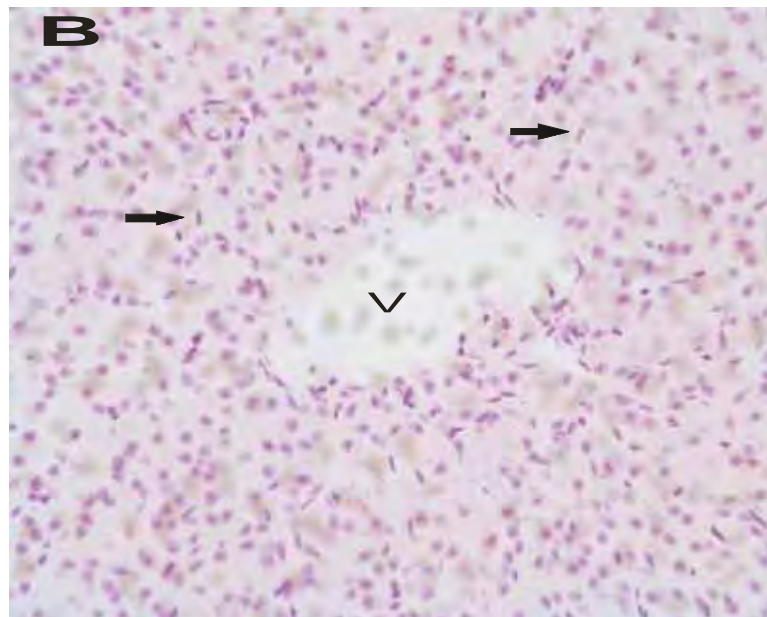
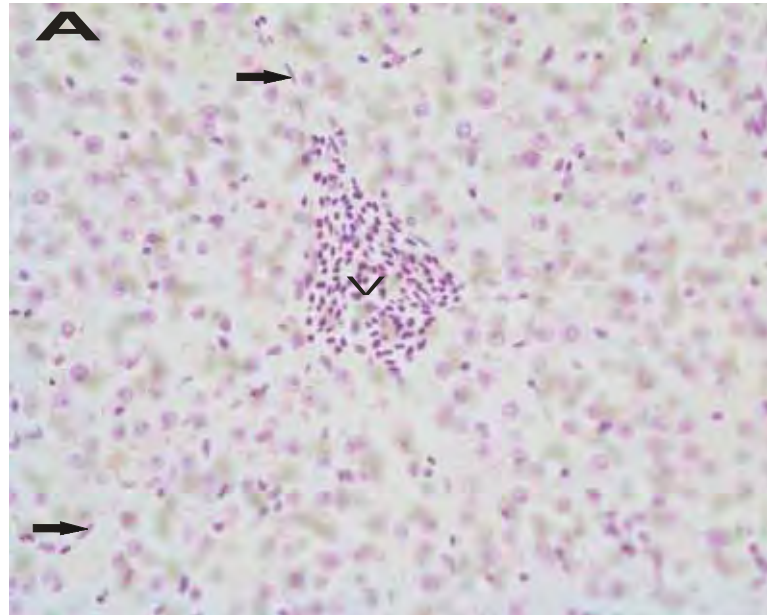
Grupo *Detergente* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Feulgen.



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *detergente*, no aumento de 400x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por “V”. As setas indicam núcleos que sofreram modificações morfológicas, apresentando-se mais afilados do que os núcleos dos outros hepatócitos normais.

Figuras 26a e 26b

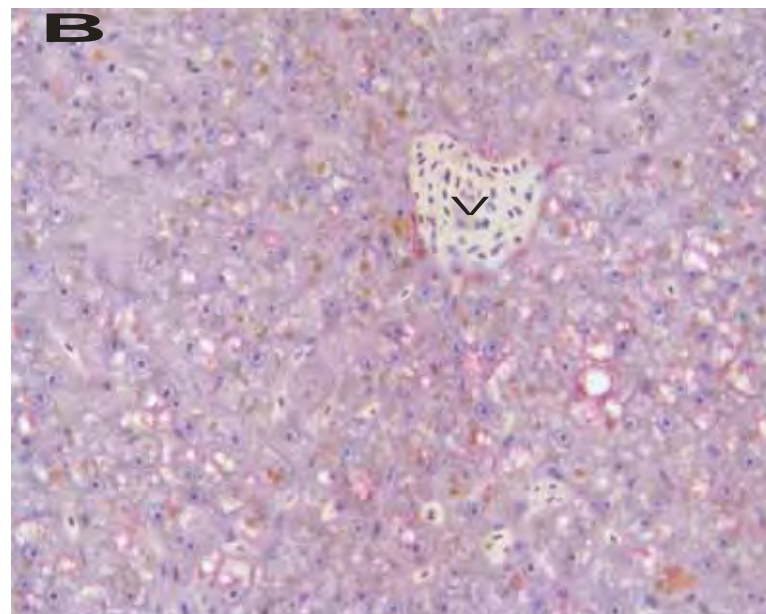
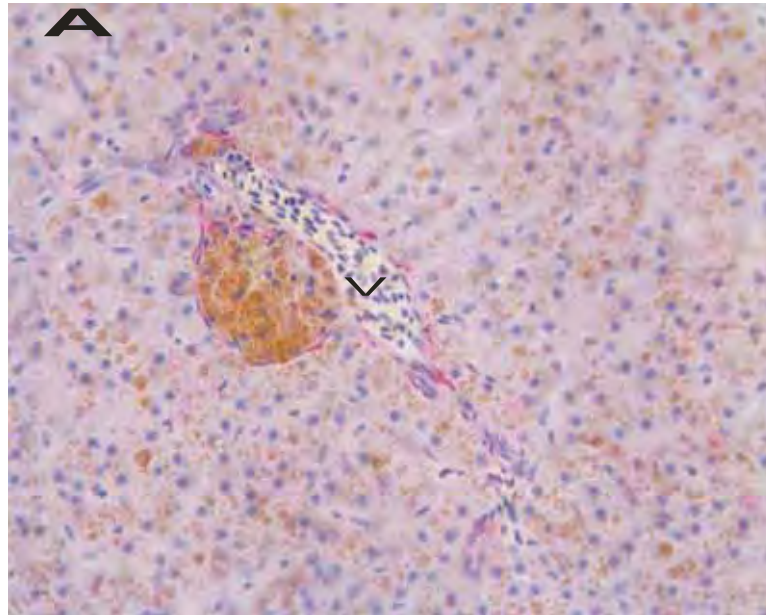
Grupo *Lago Azul* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Feulgen.



As figuras mostram uma visão geral do fígado do grupo *Lago Azul*, no aumento de 400x, nos quais pode-se observar vasos sanguíneos, indicados por "V". Nos dois tratamentos observou-se um grande número de núcleos de hepatócitos com modificações morfológicas, indicados pelas setas.

As técnicas de Picrocirius Red (figuras 27<sup>a</sup> e 27 b), Prata Amoniaca (figuras 28a e 28b) e Von Kossa (figura 29a e 29b), não revelaram nenhuma alteração entre os grupos.

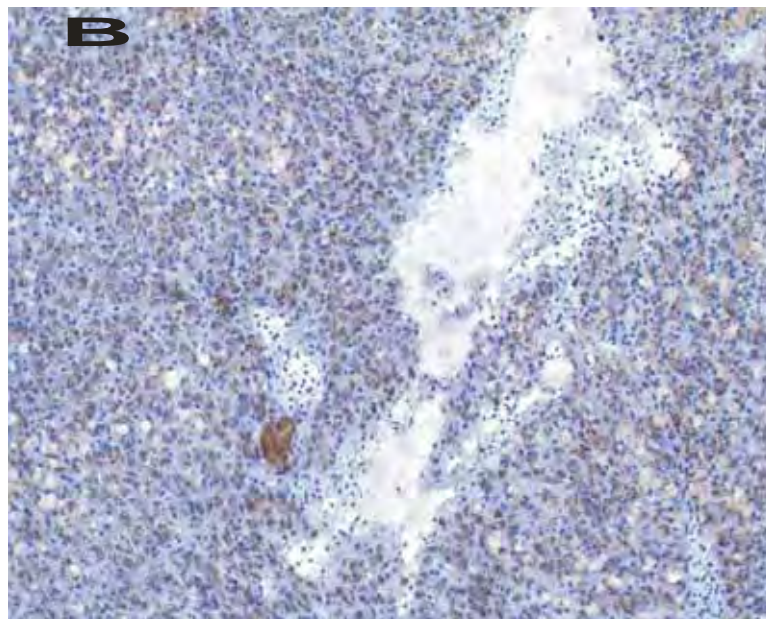
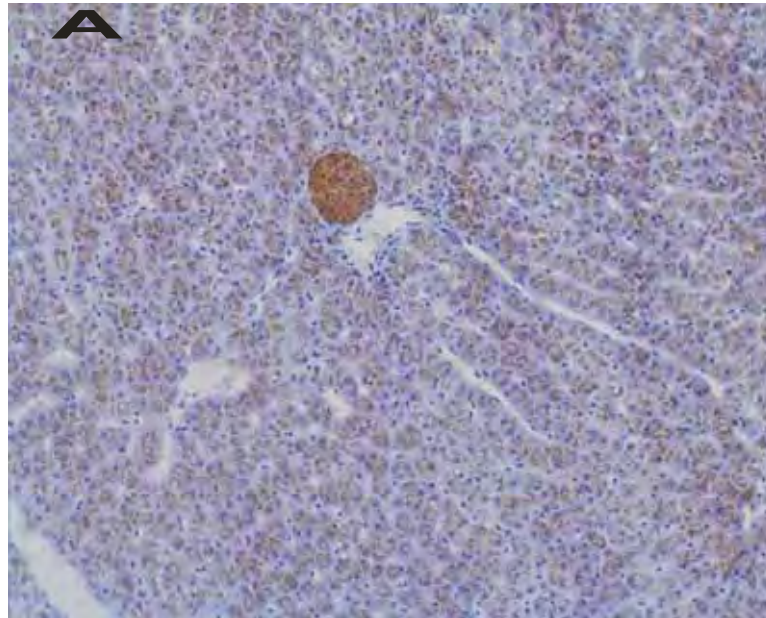
Figuras 27a e 27b - Grupo *Controle* (A) e *Lago Azul* (B) após 7 dias, corados pela técnica de Picrocirius Red



O colágeno foi marcado no entorno dos vasos sanguíneos indicados pela letra “V” e não apresentaram modificações entre os grupos em nenhum dos períodos de experimento (400x).

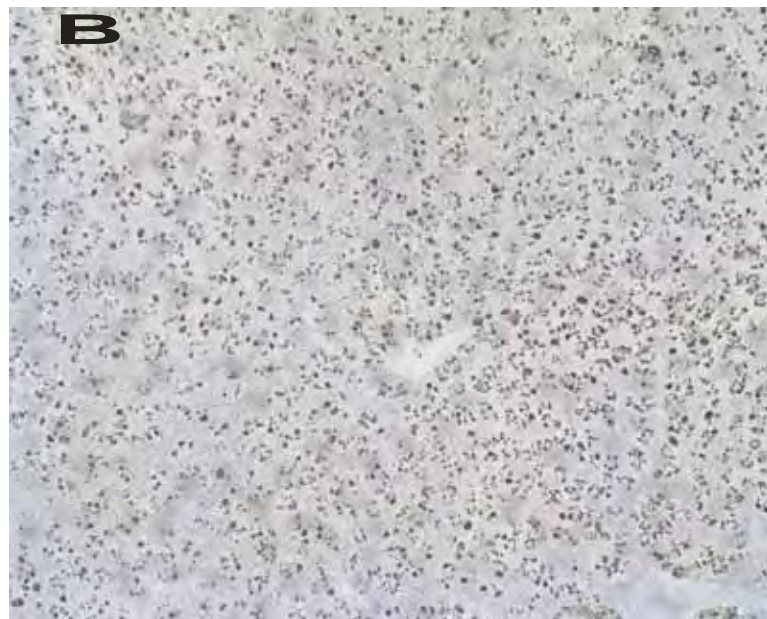
Figuras 28a e 28b

Grupo *Controle* (A) e *Lago Azul* (B) após 20 dias, corados pela técnica de Von Kossa.



Em todo o experimento as marcações de cálcio, que se apresentam como marcações marrons no citoplasma dos hepatócitos, não se alteraram entre os grupos, apenas ocorreu uma aparente diminuição devido a vacuolização do tecido (200x).

Figuras 29a e 29b  
Grupo *Controle* (A) e *Lago Azul* (B) após 7 dias, corados pela técnica de Prata Amoniacal

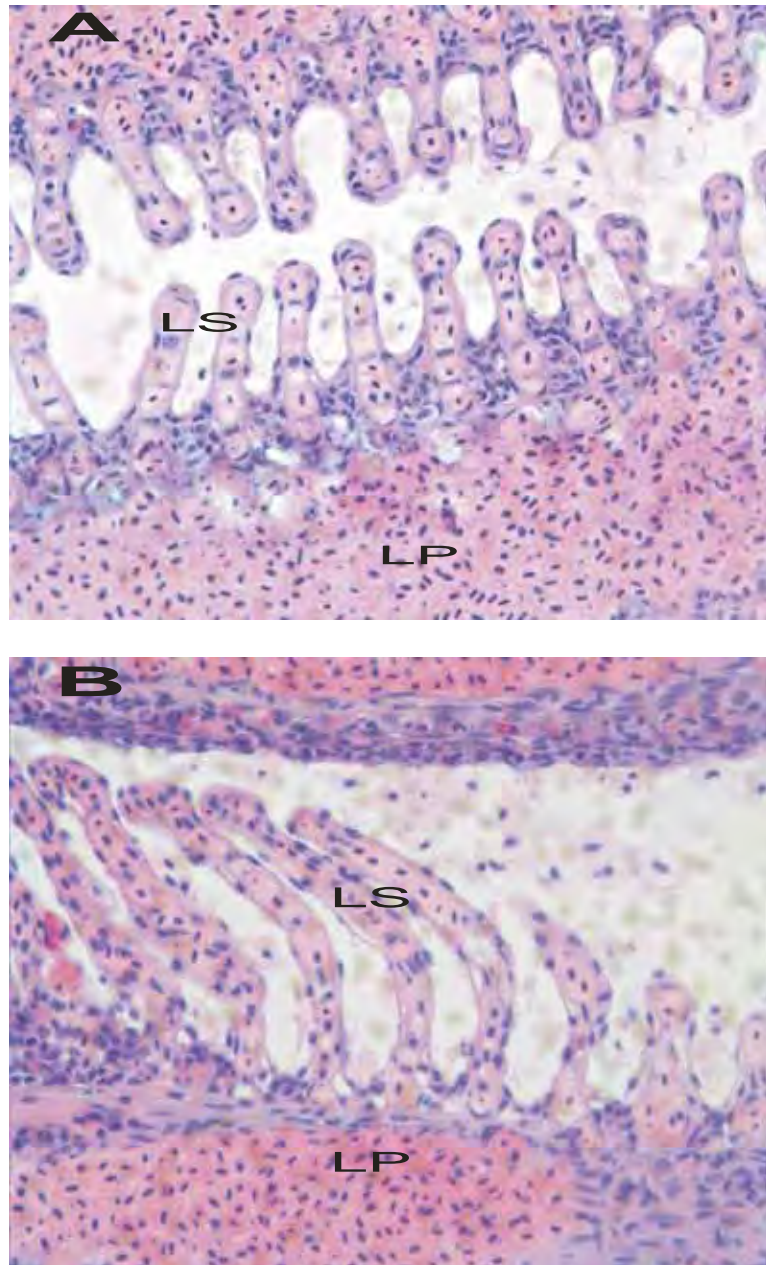


Em nenhum dos grupos houve diferenças na marcação de fibras elásticas no tecido hepático (200x).

### 5.3 - Análise das brânquias

A análise das brânquias dos indivíduos expostos a ambientes poluídos evidenciou a ocorrência da fusão de lamelas secundárias e modificações na sua morfologia tanto no grupo *detergente* quanto no grupo *Lago Azul* durante todo o experimento. (Figura 30, 31 e 32).

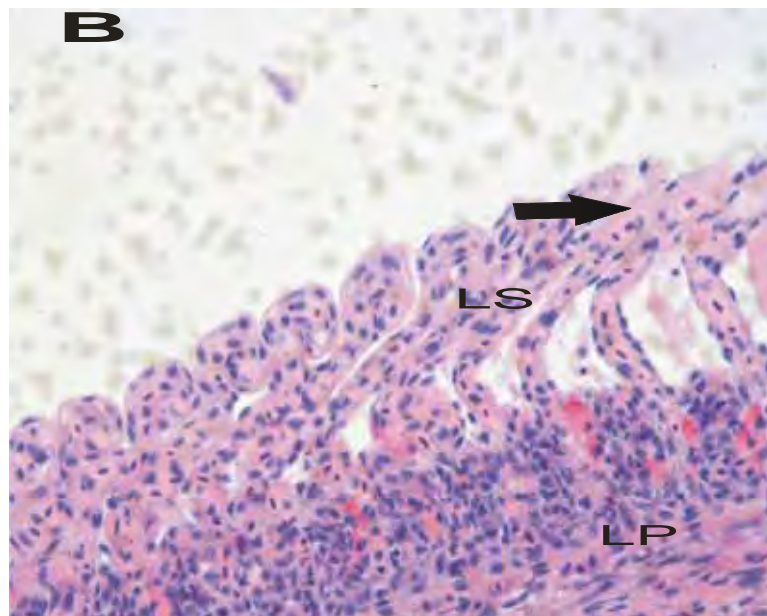
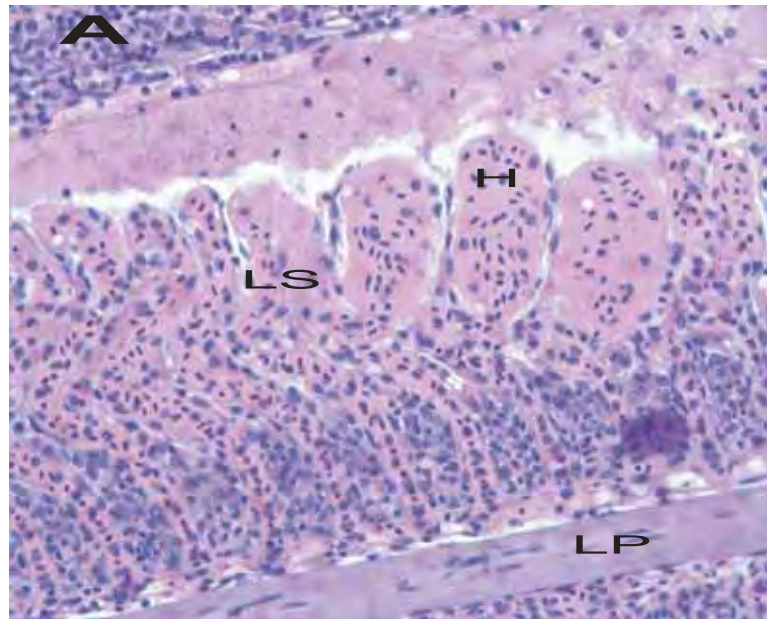
Figuras 30a e 30b - Grupo *Controle* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de H-E.



Visão geral da brânquia do grupo *controle*, sendo as lamelas secundárias representadas por “LS” e as lamelas primárias por “LP” (400x)

Figuras 31a e 31b

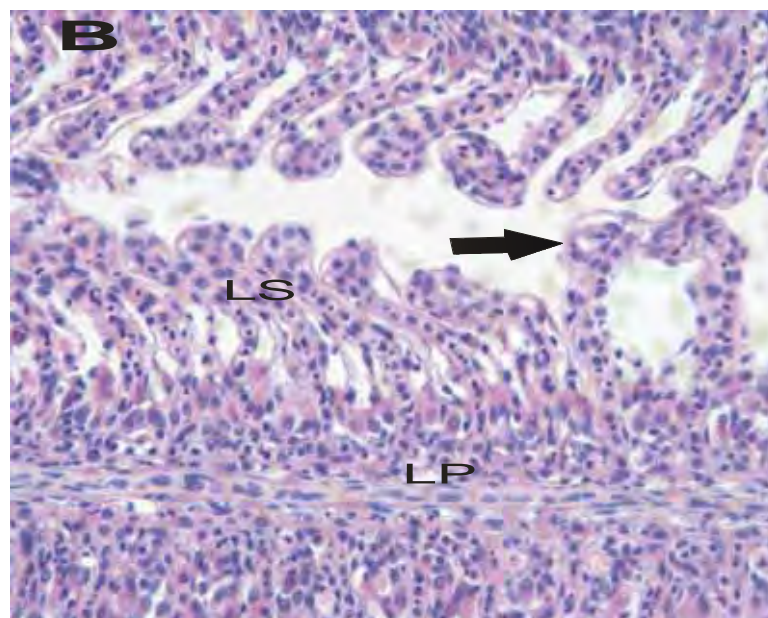
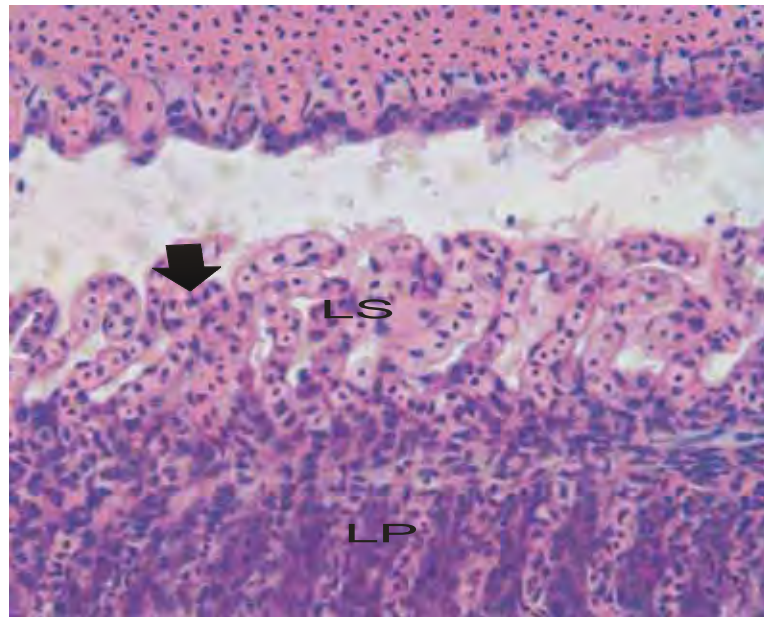
Grupo *Detergente* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de H-E.



Visão geral da brânquia do grupo *detergente*, sendo as lamelas secundárias representadas por “LS” e as lamelas primárias por “LP” (400x). Observou-se a existência de fusão lamelar, indicadas pelas setas, e hipertrofia da lamela secundária, representada por “H”.

Figura 32a e 32 b

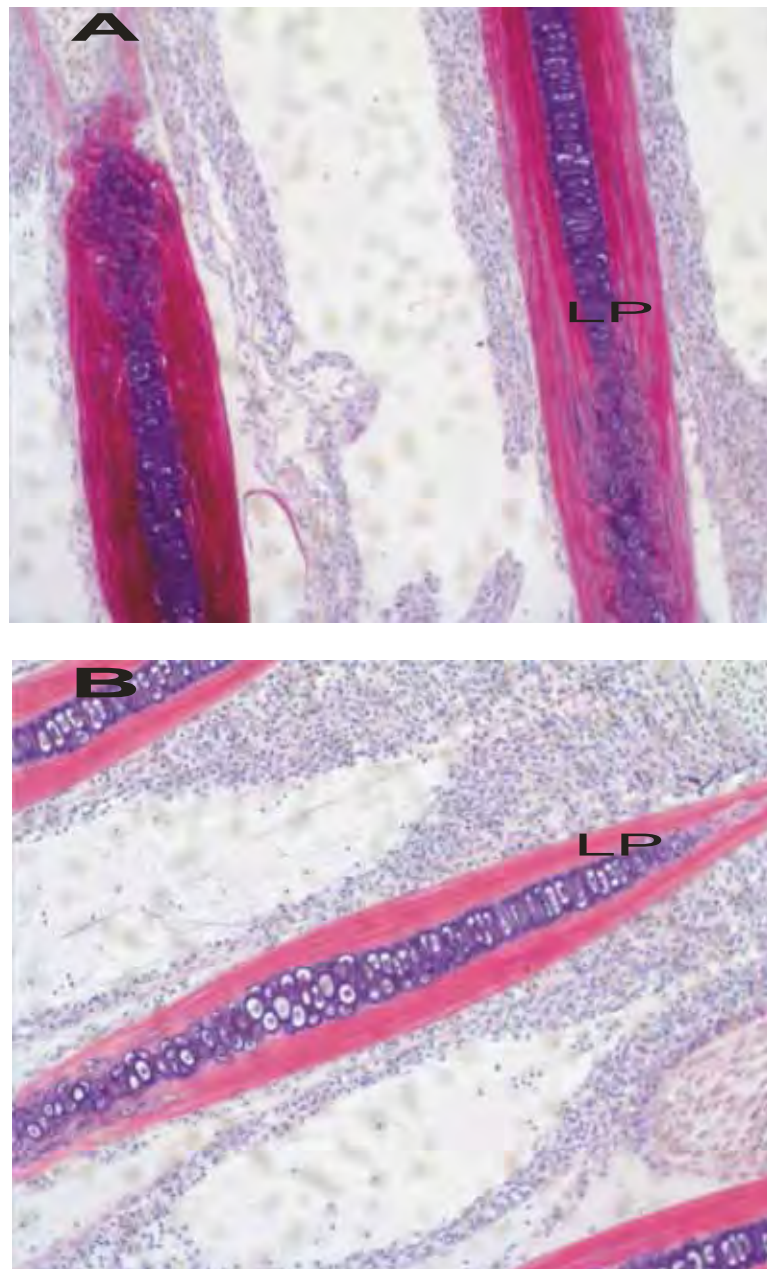
Grupo *Lago Azul* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de H-E.



Visão geral da brânquia do grupo *Lago Azul*, sendo as lamelas secundárias representadas por “LS” e as lamelas primárias por “LP” (400x). Observou-se a existência de fusão lamelar, indicadas pelas setas, nos dois períodos de experimento.

A técnica de Picrocirius Red evidenciou que apenas no grupo *detergente*, após vinte dias de experimento ocorreu a elevação na quantidade de colágeno no entorno da cartilagem encontrada na lamela primária (Figura 33a, 33b, 34a, 34b, 35a e 35b).

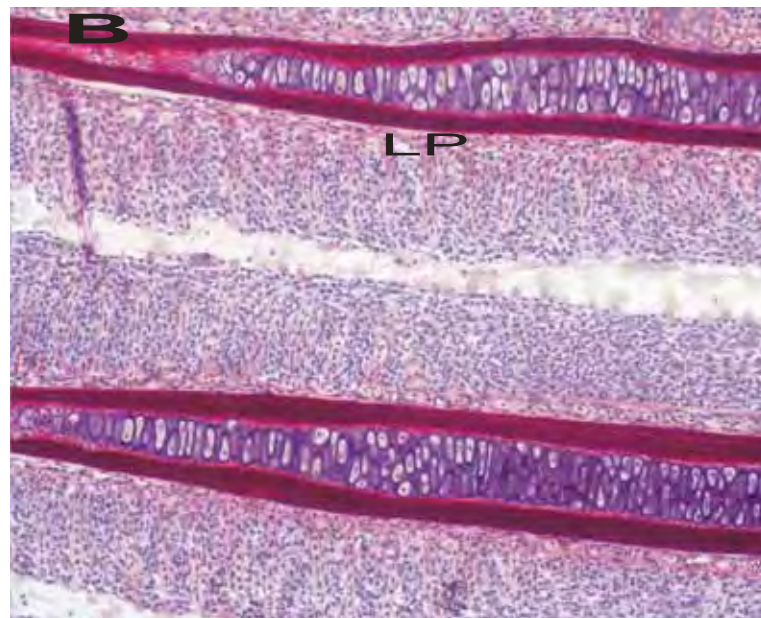
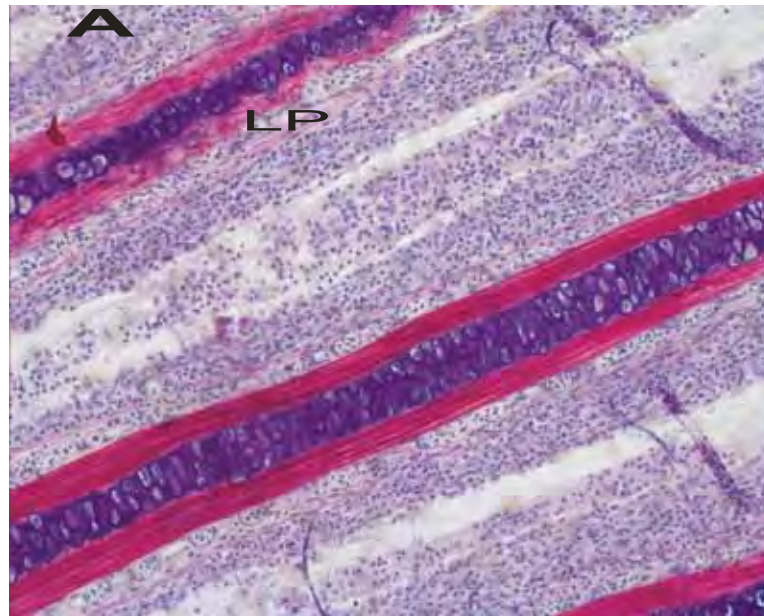
Figuras 33a e 33b - Grupo *Controle* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Picrocirius Red.



Visão geral da brânquia do grupo *controle*, sendo as lamelas primárias representadas por “LP” (200x). O colágeno foi marcado em vermelho entorno da cartilagem.

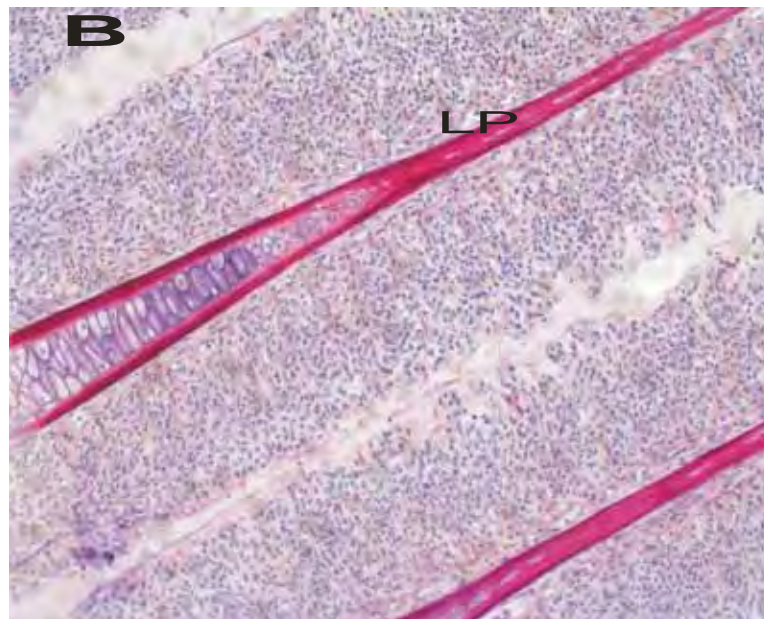
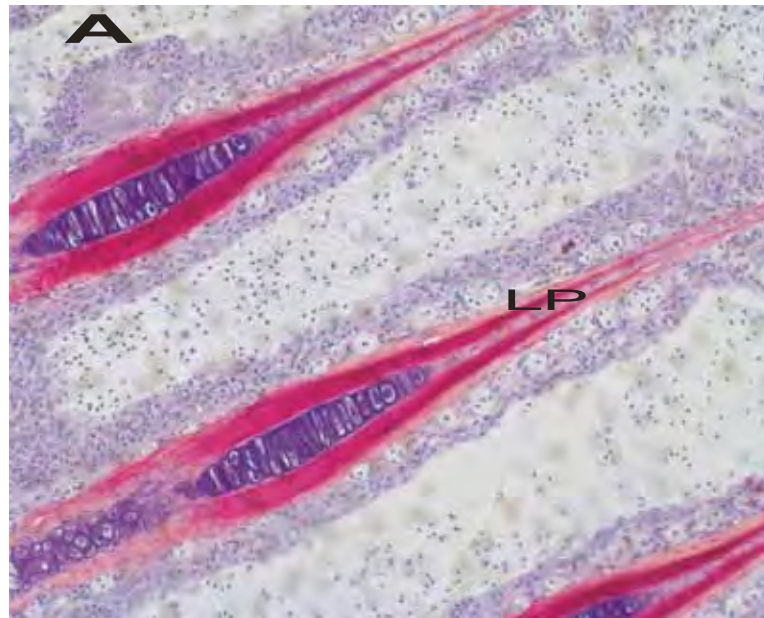
Figuras 34a e 34b

Grupo *Detergente* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Picrocirus Red.



Visão geral da brânquia do grupo *detergente*, sendo as lamelas primárias representadas por “LP” (200x). Observou-se um aumento de colágeno no grupo após 20 dias de experimento.

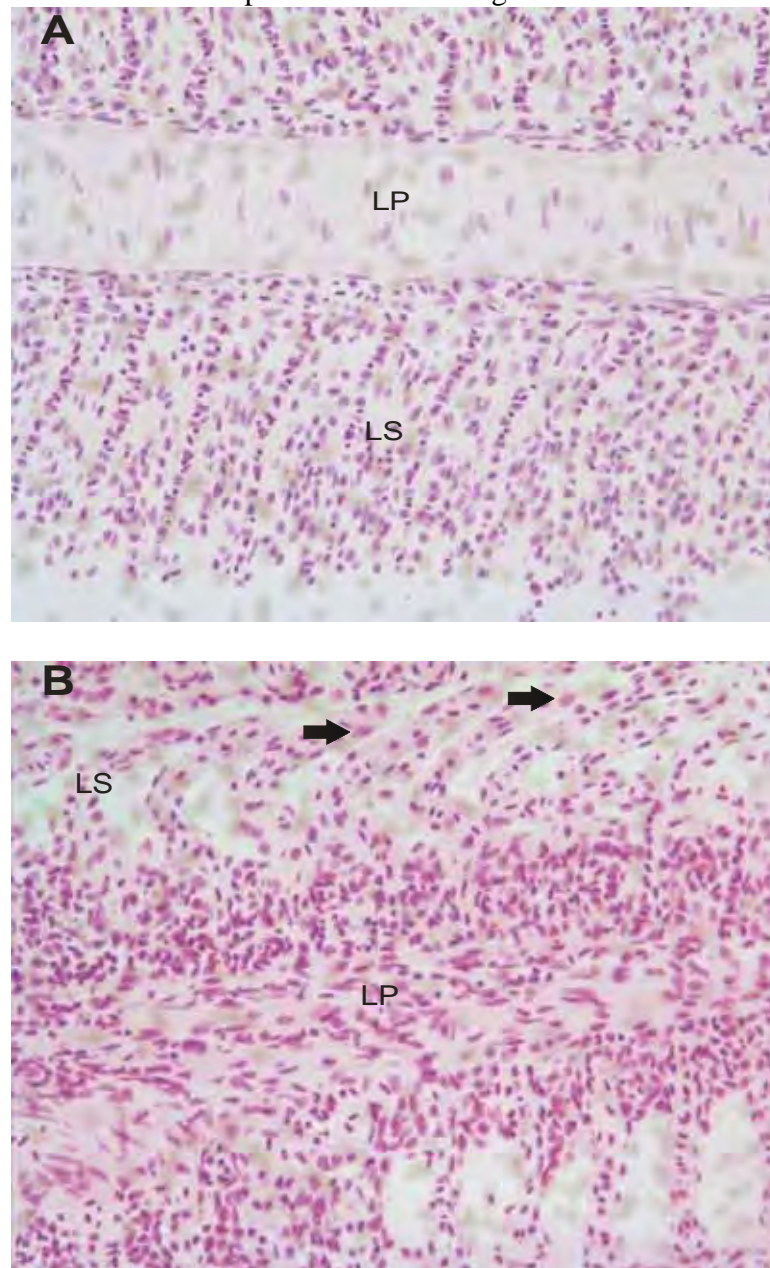
Figuras 35a e 35b  
Grupo *Lago Azul* 7 (A) e 20 (B) dias, corados pela técnica de Picrocirius Red.



Visão geral da brânquia do grupo *Lago Azul*, sendo as lamelas primárias representadas por “LP” (200x). Não foram observadas modificações na concentração de colágeno neste grupo.

A técnica de Feulgen evidenciou que ocorre o aumento no tamanho dos núcleos das células epiteliais encontradas nas extremidades das lamelas secundárias hipertrofiadas, tanto no *detergente* como no *Lago Azul* (Figuras 36<sup>a</sup> e 36b).

Figuras 36a e 36b - Grupo *Controle* (A) e *Detergente* (B) após 7 dias de experimento, corados pela técnica de Feulgen.



Visão geral da brânquia dos grupos *controle* e *detergente*, sendo as lamelas primárias representadas por “LP” e as lamelas secundárias por “LS” (400x). AS setas indicam núcleos dilatados observados em lamelas que sofreram hipertrofia, encontradas principalmente no grupo *detergente*.

Para a análise das células de cloro e de muco, mostrou-se necessário uma contagem das mesmas. Para que houvesse um número mínimo de indivíduos para a análise estatística, foram utilizados os dois indivíduos sacrificados neste experimento e também mas quatro indivíduos de cada grupo, coletados em um experimento realizado simultaneamente a esse e nas mesmas condições, no qual o material analisado neste experimento também havia sido coletado para futuras análises. Para esta contagem foram contadas as células de cloro e de muco entre 10 lamelas secundárias, contagem repetida cinco vezes em cada indivíduo. Na técnica de Von Kossa, observou-se a proliferação das células de cloro, no grupo *Lago Azul*, com P maior que 0.01 nos dois períodos do experimento; no grupo *detergente* esta proliferação só foi observada após vinte dias de exposição, com P maior que 0.01 (Tabelas 1, 2 e Figura 10). Estas células foram identificadas por possuírem grânulos de cor escura no seu citoplasma e foram localizadas entre as lamelas secundárias e em alguns casos encontradas na lamela secundária, segundo Pereira e Caetano (2009). Assim como na observação das células de cloro as contagens feitas para as células de muco, com o auxílio da técnica de PAS, observou-se proliferação destas células em todos os períodos do experimento e nos dois grupos expostos aos poluentes, com P maior que 0.01 (Tabelas 11, 12, 13, 14 e Figura 37).

Tabela 11:

<b>Controle</b>	<b>Detergente</b>	<b>Lago Azul</b>
12	12	29
9	10	33
10	12	30
10	14	30
11	10	31
13	13	28

As linhas representam as médias de células de cloro encontradas em cada um dos seis indivíduos de cada grupo, após sete dias de experimento.

Tabela 12:

<b>Controle</b>	<b>Detergente</b>	<b>Lago Azul</b>
11	23	35
9	22	42
9	20	40
10	25	37
12	20	40
10	26	41

As linhas representam as médias de células de cloro encontradas em cada um dos seis indivíduos de cada grupo, após vinte dias de experimento.

Tabela 13:

<b>Controle</b>	<b>Detergente</b>	<b>Lago Azul</b>
6	10	9
7	10	9
7	10	10
6	9	10
8	10	8
8	9	8

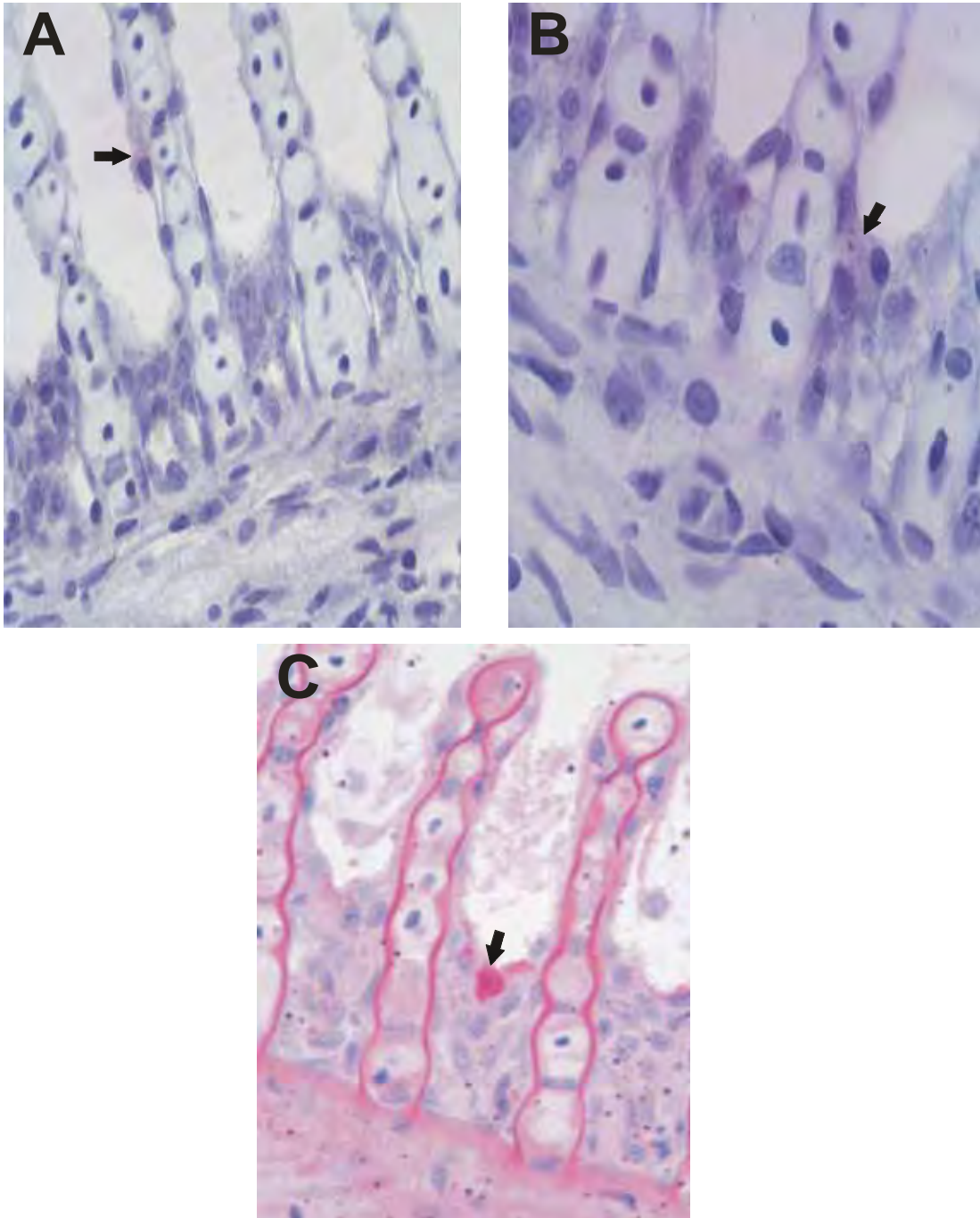
As linhas representam as médias de células muco encontradas em cada um dos seis indivíduos de cada grupo, após sete dias de experimento.

Tabela 14:

<b>Controle</b>	<b>Detergente</b>	<b>Lago Azul</b>
5	8	8
5	8	8
6	10	9
4	10	9
4	9	9
5	8	9

As linhas representam as médias de células de muco encontradas em cada um dos seis indivíduos de cada grupo, após vinte dias de experimento.

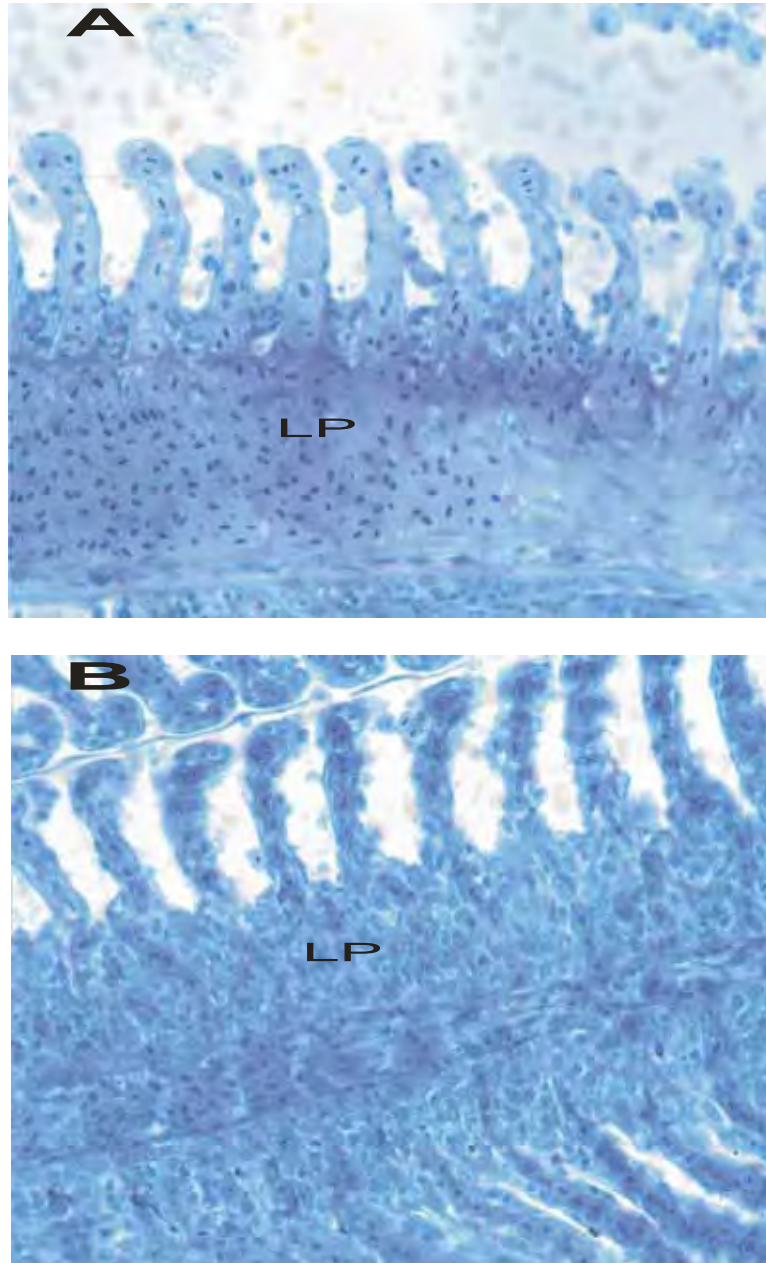
Figuras 37a, 37b e 37c - Grupo *Controle* (A) e (B), corados pela técnica de Von Kossa e (C), corado pela técnica de PAS, após 7 dias de experimento.



A figura **A** representa uma célula de cloro (seta) observada na lamela secundária no grupo **controle** (1000x). A figura **B** ilustra uma célula de cloro (seta) identificada entre duas lamelas secundárias no grupo controle (1500x). A figura **C** indica através da seta uma célula de muco encontrada na região central entre duas lamelas secundárias (400x).

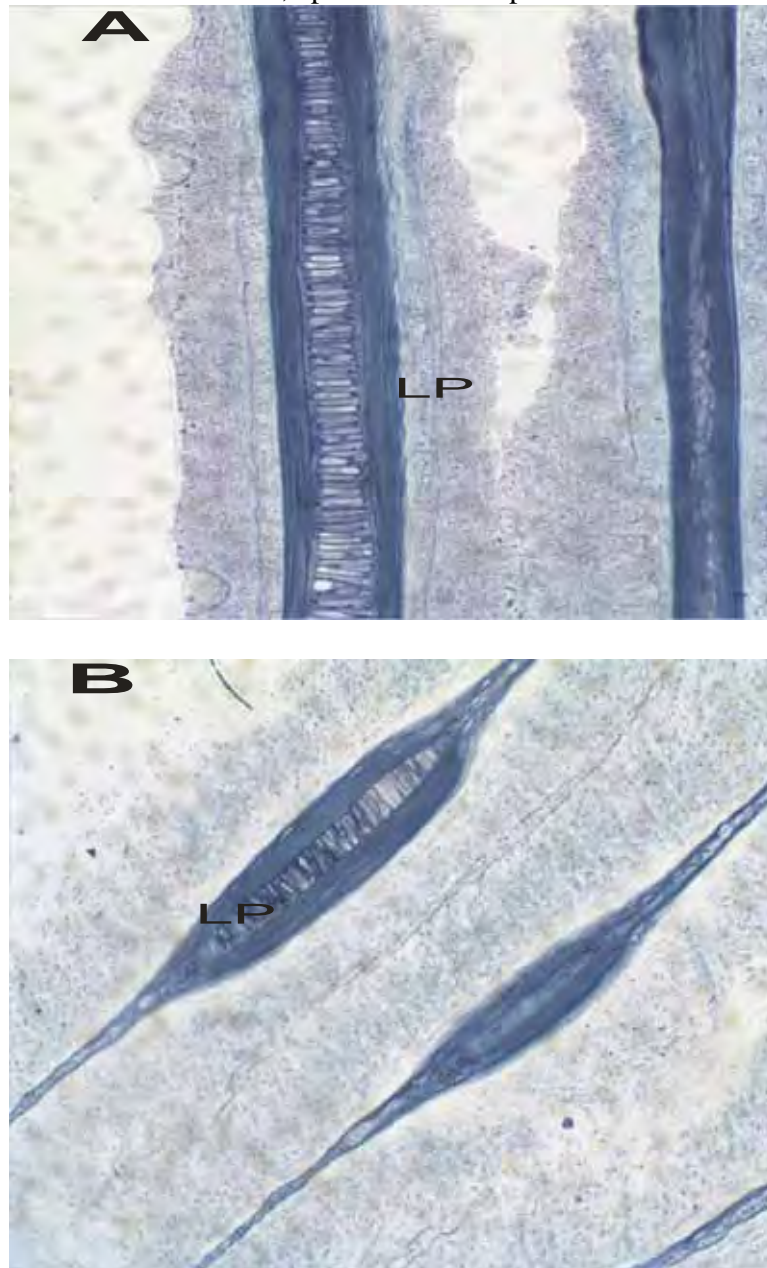
As técnicas de Prata amoniacal (Figura 38) e Azul de Bromofenol (Figura 39) não evidenciaram nenhuma alteração entre os grupos estudados.

Figuras 38a e 38b - Grupo *Controle* (A) e *Detergente* (B), corados pela técnica de Azul de Bromofenol, após 7 dias de experimento.



Visão geral da brânquia dos grupos *controle* e *detergente*, sendo as lamelas primárias representadas por “LP” (200x). Não foram identificadas diferenças na concentração protéica em nenhum dos grupos experimentados.

Figuras 39a e 39b - Grupo *Controle* (A) e *Detergente* (B), corados pela técnica de Prata Amoniacal, após 7 dias de experimento



Visão geral da brânquia dos grupos *controle* e *detergente*, sendo as lamelas primárias representadas por “LP” (200x). As fibras elásticas foram identificadas ao redor da cartilagem, entretanto não foram identificadas diferenças entre os grupos.

### **6.1 - Análises do sangue**

Segundo Tavares-Dias & Moraes (2004) os estudos hematológicos das diferentes espécies de peixes são de interesse ecológico e fisiológico, auxiliando na compreensão da relação entre as características sanguíneas, a filogenia, a atividade física, o hábitat e a adaptabilidade dos peixes ao ambiente.

Dentre os componentes do sangue, os leucócitos representam importante papel na imunidade não específica e seus valores podem ser considerados como indicadores do estado de saúde dos peixes (Ishkawa et. al. 2008). Os dados obtidos neste experimento demonstram que houve uma elevação significativa no número de leucócitos nos animais expostos a água do Lago Azul, evidenciando com isso que os poluentes químicos existentes ali estavam atuando de forma semelhante a um antígeno, fazendo com que suas células de defesa, não específicas, proliferassem, durante o período de experimento. Esta elevação não foi encontrada no grupo *detergente*. Os detergentes biodegradáveis são um dos compostos despejados nas águas do Lago Azul, deste modo evidencia-se que estes não estão entre os poluentes químicos encontrados na água do lago e que seriam responsáveis pela uma elevação no número de leucócitos.. Estes dados podem ser comparados com os de Romão et. al. (2006) e Ates et. al. (2007) que demonstraram em seus trabalhos que parâmetros sanguíneos podem ser usados como indicadores de parâmetros ambientais aquáticos; sendo que e seus trabalhos após o levantamento bioquímico e hematológicos de peixes expostos a poluentes, encontraram variações incluindo a elevação no número de leucócitos totais nos indivíduos expostos a e a ambientes impactados como lagos urbanos.

Em contraste com as plaquetas de mamíferos que são fragmentos de células anucleadas os trombócitos de peixes são células completas, sendo importantes para a homeostasia e a coagulação sanguínea (Tavares-Dias & Moraes, 2004; Tavares-Dias & Mataqueiro, 2008). Em peixes essas células possuem ainda outras funções, entre elas, sugere-se que respondam a situações mórbidas de modo semelhante às plaquetas nos mamíferos e reduzem a predisposição a infecções (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Os resultados apresentados mostram que no período de 7 dias de experimento, ocorreu um leve aumento no número de trombócitos resultante, possivelmente do pouco tempo de adaptação que o animal teve ao ambiente mais poluído da água do Lago Azul e pelo fato de que o grupo *detergente* apresentar o valor de trombócitos mais baixo dos três grupos. Esta afirmação baseia-se no fato de que este número ficou estável quando comparado com o grupo controle durante todo o experimento. O grupo *detergente* apresentou um decréscimo no número de trombócitos, em comparação com o *controle* após vinte dias de experimento o que sugere que a exposição ao detergente pode ocasionar uma diminuição da capacidade de coagulação sanguínea, da manutenção da homeostasia e da prevenção contra infecções. Esta diminuição pode ser atribuída ao detergente, pois segundo Tavares-Dias & Moraes (2004), existe uma relação inversa entre o número de trombócitos e leucócitos, ou, seja, o número de trombócitos aumenta quando o de linfócitos diminui, sendo assim caso este evento estivesse ocorrendo de forma natural, o número de leucócitos deveria ter aumentado e não foi o que ocorreu, pois os mesmos se mantiveram estáveis com relação ao grupo controle.

Na contagem total de células, os resultados foram os mesmos da contagem de leucócitos, ou seja, ocorreu uma elevação significativa apenas no grupo exposto a água do Lago Azul, evidenciando mais uma vez que tais poluentes afetaram os espécimes de forma semelhante a um antígeno, ocasionando a proliferação de tais células.

## 6.2 - Análise do fígado

Segundo Verlag (1982) as células hepáticas possuem diversas funções vitais como a metabolização de proteínas, lipídeos e carboidratos, atuam na desintoxicação do organismo e na hematopoiese, durante a fase larval, além de estarem envolvidos na produção de anticorpos. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam que a exposição de peixes a ambientes contaminados pode ocasionar danos neste órgão vital, como a vacuolização dos hepatócitos e a diminuição das reservas de glicogênio.

A degeneração encontrada no fígado dos indivíduos analisados neste experimento pode ser incluída no estágio dois de degeneração proposto por Maduenho & Martinez (2007), o qual é caracterizado por vacuolização nuclear, degeneração citoplasmática e nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos, devido principalmente a degradação citoplasmática e a vacuolização encontrada tanto nos indivíduos dos ensaios *Lago Azul* e *detergentes*. Estes resultados também

foram encontrados em estudos semelhantes realizados por Simonato et al (2007) e Jiraungkooskul et. al. (2002) que identificaram como principais alterações aumento do volume nuclear e celular, degeneração citoplasmática, degeneração nuclear, vacuolização nuclear e estagnação biliar. Estes danos provavelmente são causados devido um acúmulo de toxinas acumuladas pelo fígado que através do processo de desintoxicação, que ao causarem a degeneração dos hepatócitos acabam por limitar as funções vitais do fígado, prejudicando o organismo como um todo.

Segundo Verlag (1982) A função do fígado como glândula digestiva é de secretar bile, a qual é produzida pelas células hepáticas e transportada para canalículos intracelulares e posteriormente levada para canalículos extracelulares. O presente trabalho evidenciou uma diminuição na concentração de bile no tecido hepático, o que evidencia que as células expostas aos poluentes perderam sua função de produzir esta secreção, o que conseqüentemente afeta diretamente o processo digestivo dos indivíduos.

Quanto a análise da concentração proteica realizada, observou-se a concentração das mesmas no grupo exposto ao detergente, nos primeiros sete dias, no entorno dos vasos. Isto se deve, provavelmente, a uma alta atividade das células mais próximas aos vasos, que acabam por entrar em contato mais rapidamente com as toxinas do que as células que se encontram no interior do tecido; devido a isso é que se observa uma vacuolização mais rápida das células mais próximas aos grandes vasos. Como os animais expostos a água do Lago Azul apresentaram uma vacuolização mais rápida dos hepatócitos, o metabolismo das mesmas provavelmente encontra-se bastante debilitada, o que ocasionaria uma diminuição da concentração proteica celular, o mesmo que ocorre no grupo exposto ao detergente após vinte dias de experimento.

Segundo Junqueira & Carneiro (2006) lipídios e carboidratos são armazenados no fígado na forma de triglicerídeos e glicogênio, respectivamente, sendo esta capacidade de armazenar metabólitos importante, porque supre o organismo de substratos energéticos no período entre refeições. Como foi observado neste experimento ocorreu a diminuição na concentração de glicogênio nos indivíduos expostos a ambientes poluídos, isto revela que possivelmente uma parte deste nutrientes foi recrutada para o combate contra a intoxicação e possivelmente com a deteriorização dos hepatócitos foi diminuída a capacidade de armazenamento de nutrientes dos mesmos.

Segundo Alberts et. al. (2006) células em apoptose perdem sua forma devido a quebra do citoesqueleto e seu núcleo também perde sua forma até a degradação de seu material genético. Os núcleos deformados encontrados indicam que após a exposição a poluentes muitas células entram em apoptose afetando diretamente o funcionamento do órgão. Este elevado número de células em apoptose poderia explicar a metacromasia observada na técnica de Hematoxilina – Eosina, na qual, possivelmente a cor azul representa fragmentos de DNA resultantes da morte celular de hepatócitos.

### 6.3 - Análise das brânquias

Segundo Torres & Christofolletti (2008) a fusão lamelar pode ter um caráter protetor, já que diminui a superfície branquial. Entretanto a hiperplasia epitelial, bem como seu desprendimento, pode possuir uma função defensiva, pois aumentam a distância que as substâncias presentes na água têm que percorrer para alcançar a corrente sanguínea. A fusão lamelar encontrada em todos os grupos expostos a poluentes neste experimento evidencia uma tentativa do organismo de evitar a maior absorção de poluentes pelo organismo. Outro resultado encontrado foram modificações morfológicas nos filamentos secundários, que segundo Perry & Laurent (1993) podem ser considerados como tentativas de se conservar algumas funções fisiológicas; que podem ser comprovadas pela modificação no tamanho dos núcleos das regiões terminais das lamelas secundárias. Estes resultados também foram encontrados por outros autores como Jiraungkooskul et. al. (2002), que obteve como principais resultados proliferação das células das lamelas secundárias, hiperplasia, fusão lamelar e aneurisma na brânquia, após a exposição a herbicidas.

A elevação na quantidade de colágeno encontrada nas brânquias dos indivíduos expostos ao detergente pode ser considerada como uma modificação da estrutura branquial, tendo em vista possivelmente a manutenção da estrutura branquial bem como suas funções fisiológicas.

Segundo Perry (1997), vários estudos sugerem que as células de cloro são os sítios ativos da regulação do transporte de íons em peixes marinhos e de água doce; a regulação, sobretudo em peixe marinhos pode representar uma parcela substancial do orçamento energético, devido à hidrólise de ATP pelos vários transportadores íon-ATPases. Estes incluem  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ -ATPase de alta afinidade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e, talvez, o mal-definido  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ -ATPase. Em condições iônicas desfavoráveis ou em contato com agentes tóxicos, ocorre a proliferação das células de cloro nos

filamentos e na superfície lamelar da brânquia (Perry, 1997). Segundo Bindon et. al. uma das mais estudadas e fisiologicamente significantes ajustes morfológicos envolvem a variação no número e/ou tamanho das células de cloro. Estas afirmações foram comprovadas neste experimento no qual ocorreu a proliferação das células de cloro evidenciando uma tentativa do organismo em regular o desequilíbrio iônico causado pelos poluentes em seu ambiente.

Segundo Breseghelo et. al. (2004) as células de muco presentes no epitélio branquial de peixes são responsáveis por um dos mecanismos de proteção deste epitélio que é a secreção de uma camada de glicoproteínas e glicolipídeos. Segundo Torres & Christofolletti (2008) o muco atua como uma barreira, estabelecendo função protetora e tem importância também na facilitação da regulação iônica. Neste estudo, identificou-se uma proliferação destas células, cuja principal função parece ser a de estabelecer uma barreira de proteção contra a entrada de poluentes, que também são confirmadas por todas as alterações morfológicas encontradas. Esta proliferação foi também relatada por estudos feitos por Breseghelo (1994) e Biagini et. al. (2006), com exposição aguda a poluentes, como foi o caso do presente trabalho. Segundo Takashima e Hibiya (1995) o acúmulo de muco na superfície branquial pode ocasionar à diminuição na eficiência das trocas gasosas, com isso a proliferação observada pode estar elevando os danos aos filamentos branquiais, tendo em vista a possível diminuição dos níveis de oxigênio nas células dos filamentos branquiais, o que ocasionaria diversos danos podendo levá-las a morte.

---

## 7 - CONCLUSÃO

### 7.1 - Análises do sangue

1) As análises de sangue demonstraram que este serviu como um bom bioindicador, sendo que apresentou uma elevação no número de leucócitos no grupo exposto a água do lago, comprovadamente poluído.

2) A concentração de detergente utilizada demonstrou a possibilidade de este estar atuando na alteração das funções vitais como, por exemplo, a coagulação do sangue nos processos de lesão.

### 7.2 - Análise do fígado

As análises realizadas no tecido hepático demonstraram que ambos os poluentes testados afetam a morfologia e os acúmulos de substâncias encontradas neste órgão, o que acarreta em uma deficiência nas funções vitais deste órgão. Concluí-se também que os detergentes mesmo em elevadas diluições afetam os indivíduos, o que evidencia a necessidade de um maior controle no descarte deste poluente.

### 7.3 - Análise das brânquias

A partir dos resultados obtidos é possível concluir que os poluentes testados geram alterações morfológicas que por muitas vezes podem ser consideradas como tentativas do organismo de evitar o contato com os poluentes entretanto podem debilitar as funções primordiais das brânquias como as trocas gasosas, além de ocasionar o desequilíbrio iônico observado pela proliferação das células de cloro.

## 8 - REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L.H. et al. Metabolical effects of folidol 600 on the neotropical freshwater fish matrinxã, *Brycon cephalus*. Environ. Res., San Diego, v. 95, p. 224-230, 2004.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.. Biologia Molecular da Célula, 4ª Edição. São Paulo: editora Artimed, 2006.
- ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C. de; JOHNSON, C.R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. Química orgânica. 2ª Edição. Rio de Janeiro: LTC, 1978. Tradução de Alencastro, R. B.; Peixoto, J. S.; Pinho, L. R. N.
- ATES, B.; ORUN, I.; TALAS, Z. S.; DURMAZ, G.; YILMAZ, I.. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup>. Fish Physiology and Biochemistry. 24 July 2007, vol. 34, p.53-59.
- BEHMER. O.A.; RODRIGUES, C.J.; TOLOSA, E.M.C. de; NETO, A. G. de F. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2.ed. Barueri, SP: Manole, 2003.
- BIAGINI, F. R.; FONTANETTI, C. S.; DAVID, J. A. O.. Análise ultramorfológica, histológica e histoquímica de brânquias de *Oreochromis niloticus* (Tilápia do Nilo) submetidos a águas poluídas tratadas. Resumo expandido XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Rio Claro – SP, Divulgado em CD, 2005.
- BINDON, S. D.; GILMOUR, K.M.; FENWICK, J.C.; PERRY, S.F.. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Journal of experimental Biology. 197, 47–63, 1994.
- BRESEGHELO, L.; CARDOSO, M. P.; BORGES-DE-OLIVEIRA, R.; COSTA, M. F.; BARRETO, J. C. B.; SABÓIA-MORAES, S. M. T.; YAMADA, A. T. Efeitos do fluoreto de sódio no epitélio da brânquia do peixe Guaru (*Poecilia vivipara*). Brazilian Journal Vet. Res. Anim. Sci. São Paulo, V.41, n. 4, 2004.
- DAVENPORT, H. A. Histological and Histochemical Technics. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1961.
- EVANS, D.H.. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. The American Journal of Physiology. 295, 704-713, 2008.
- ISHIKAWA, N.M.; RANZANI-PAIVA, M.J.T.; LOMBARDI, J.V.. Metodologia para quantificação de leucócitos totais em peixe, *OREOCHROMIS NILOTICUS* (Total leukocyte

- counts methods in fish, *Oreochromis niloticus*). Archives of Veterinary Science, v.13, n.1, p. 54-63, 2008.
- JIRAUNGKOORSKUL, W. et al. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sci. Asia., New Delhi, v. 28, n. 2, p. 121-127, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. Histologia Básica. 10ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.. Histologia Básica. 11ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2008.
- MACHADO, M. R. . Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. Unopar Científica, Londrina, v. 1, nº 1, p. 63-76, 1999.
- MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R.. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety, submetido ao final de 2007.
- 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.
- MAURO, C. A. de. Rio Claro – O lançamento “in natura” de esgotos em corpos d’água. In: Curso de extensão universitária: vamos conhecer Rio Claro. Laboratório de Planejamento Municipal – LPM, DEPLAN – IGCE/UNESP, Rio Claro, 1993. p. 67-86.
- NILSSON, G. E.; Gill remodeling in fish – a new fashion or an ancient secret? The Journal of Experimental Biology. Publicado online em junho 2007.
- PAULETE, J.; BEČAK, W. Técnicas de Citologia e Histologia. 2 Vols. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976.
- PEARSE, A. G. E. Histochemistry: Theoretical and Applied. 4 ed. Churchill Livingstone: Edinburgh, London, Melbourne and New York, 1985.
- PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. Annual Review of Physiology. vol. 59, p.325-47, outubro 1997.
- PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. Fish Ecophysiology. London, p. 231-264, 1993.
- PERRY, S.F.; WALSH, P.J.. Metabolism of isolated fish gill cells: Contribution of epithelial chloride cells. The Journal of Experimental Biology. 144, 507-520, 1989.

POUGH, H; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. A vida dos vertebrados. 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo Ltda, 2003.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*, Brazilian Archives of Biology and Technology. Curitiba, vol. 49 n° 3. May 2006. ISSN 1516-8913

ROY, D., Statistical analysis of anionic detergent-induced changes in the goblet mucous cells of opercular epidermis and gill epithelium of Rita rita (Ham.) (Bagridae: Pisces), Ecotoxicol. Environ. Saf. 15 (1988), pp. 260–271.

SILVA, R. G. da. Análise da estrutura genética populacional do curimatá (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP. 112f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade do Estado de São Paulo, São Paulo, 2006.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R.. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicology and Environmental Safety. vol. 69, Janeiro 2008, p.112-120.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T.. Atlas of Fish Histology. 2° ed. Tóquio: Kodansha, 1995.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. de. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto: M.Tavares-Dias, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; MARTINS, M. L.; MORAES, F. R. Características hematológicas de teleósteos brasileiros: Variáveis do Piauçu *Leporinus macrocephalus* Garavello & Britski, 1988 (Anostomidae). Naturalia: Revista de Biologia. São Paulo, vol. 25, p. 39-52, 2000. ISSN 0101-1944.

TAVARES-DIAS, M.; MATAQUEIRO; M.I.. Características hematológicas, bioquímicas e biométricas de *Piaracus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae) oriundos de cultivo intensivo. Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, vol. 26, n° 2, p.157 – 164, 2008.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLISON, B.; HARTMAN, A.; KOBAYSHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis. vol. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES, D. L. F. F.; CHRISTOFOLETTI, C. S. F.. Análise de Brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces) Residentes EM Ambiente Lântico Impactado. Trabalho de Conclusão de curso apresentado ao Departamento de Biologia de UNESP – Campus de Rio Claro. 39 páginas, 2008.

VERLAG, G. F. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. Tokyo: Kodansha Ltd. 1982.

VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 2007, Caxambu – MG. EFEITOS AGUDOS DO INSETICIDA DIMILIN EM PARÂMETROS HISTOLÓGICOS DO PEIXE *Prochilodus lineatus*: Anais. Cxambu; MADUENHO, L.P.; MENDES, J.P.; MARTINEZ, C.B.R. (2007).