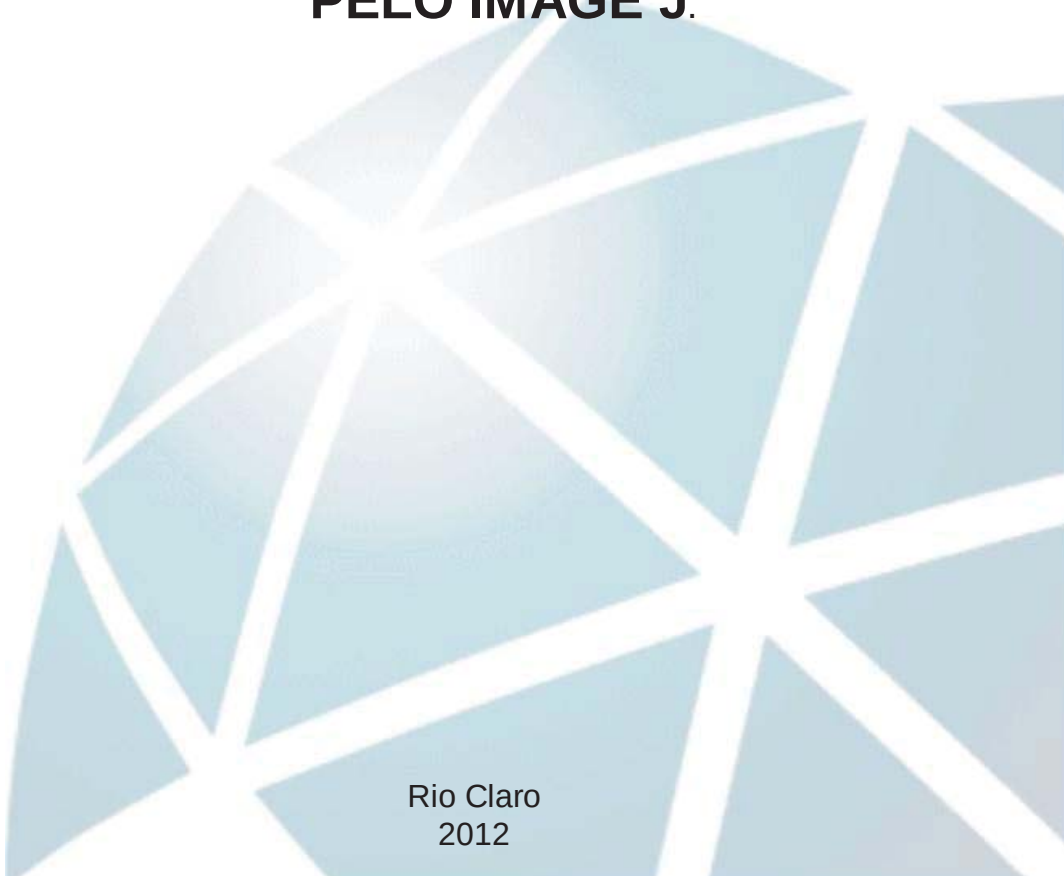

Ciências Biológicas

VANESSA ELLEN WENDT CAMPOS

**ANÁLISE DO FÍGADO DE PEIXES DA
ESPÉCIE *PROCHILODUS LINEATUS* DE
AMBIENTES ALTERADOS, QUANTIFICADA
PELO IMAGE J.**



Rio Claro
2012

VANESSA ELLEN WENDT CAMPOS

ANÁLISE DO FÍGADO DE PEIXES DA ESPÉCIE *PROCHILODUS*
LINEATUS DE AMBIENTES ALTERADOS, QUANTIFICADA PELO
IMAGE J.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano

Co-orientador: Bruno Fiorelini Pereira

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

Rio Claro

2012

597
C198a

Campos, Vanessa Ellen Wendt

Análise do fígado de peixes da espécie *Prochilodus lineatus* de ambientes alterados, quantificada pelo ImageJ. / Vanessa Ellen Wendt Campos. - Rio Claro : [s.n.], 2012

37 f. : il., figs., gráfs.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Flávio Henrique Caetano

Co-Orientador: Bruno Fiorelini Pereira

1. Peixe. 2. Histologia. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família que sempre me apoio em todas as minhas decisões e sempre acreditou que eu conseguiria chegar aonde cheguei. Quem diria que a menina caçula que vivia agarrada com a mãe iria prestar vestibular numa faculdade pública no interior, iria passar e sairia de casa? Pois bem, eles nunca deixaram que eu acreditasse que isso era impossível, sempre me mostraram que com esforço, dedicação e coragem nós conseguimos chegar onde queremos. Me ensinaram a ser independente, responsável e a escolher o caminho que me faria feliz. Muito obrigada, Marily, Claudio, Lulu, vó Herta, tia Marcia, tia Ivanir, tio Clóvis, Tatá, Marquinhos. Família Zike Tuma obrigada por todo o apoio e carinho nesses anos.

Gostaria de agradecer a Dafne pela sua amizade, apesar da distância e do tempo separadas o companheirismo e o amor de irmã não mudou nesses quatro anos, obrigada pelo ombro amigo dos momentos difíceis, pelos conselhos e pelas palavras sempre carinhosas.

Gostaria de agradecer a minha companheira de laboratório, Luá, por me fazer companhia em inúmeras manhãs e férias, me ajudar com as técnicas, me dar conselhos, me ensinando que tudo na vida tem um lado bom. Obrigada por me acolher como uma irmã mais velha.

Acredito que amigos são como uma família que nós escolhemos, sendo assim, gostaria também de agradecer a minha família que esteve comigo em muitos momentos, brincadeiras, risadas, provas, baladas, colas, enfim, que me acompanharam nesses quatro anos de graduação: Malu, Pah, Ju, Lary, Lê, Bre, Dani, Bia, Biga, Boi, Jorginho, Tcherbi, Febem, Carioca, Baby, Tibu, Mil, Lú, Laís, Raquel. Obrigada CBI 09.

Gostaria de agradecer ao meu orientador e co-orientador, Flávio e Bruno, pela oportunidade de estagiar no grupo de peixes, por terem me ensinado todas as ferramentas que foram necessárias para a realização deste trabalho e para a minha formação como bióloga. Assim como o Guilherme, obrigada pela ajuda e pela paciência que sempre teve comigo.

Gostaria de agradecer também ao RURC, vocês mostraram para mim o que é um time unido, com força e garra. Obrigada pela oportunidade de fazer parte dessa equipe, de treinar e jogar com vocês.

A todas as pessoas que fizeram e fazem parte da minha vida gostaria de agradecer de coração pela ajuda, muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO	4
2. INTRODUÇÃO.....	5
2.1 Biologia de <i>Prochilodus lineatus</i>	5
2.2 A importância do fígado de peixes.....	6
2.3 Detergentes biodegradáveis.....	8
2.4 Caracterização do Lago Azul	8
2.5 Ecotoxicologia e a sua importância.....	9
2.6 Justificativa.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
4. MATERIAL.....	13
5. METODOLOGIA.....	14
5.1 Análise quantitativa da área ocupada pela bile.....	15
5.2 Análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio.....	15
5.3 Protocolos de histologia e histoquímica.....	17
6. RESULTADOS.....	18
7. DISCUSSÃO.....	30
8. CONCLUSÃO.....	32
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. RESUMO

Além de ser bom bioindicar a espécie *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) também apresenta importância econômica, ecológica e ampla distribuição na região neotropical. A ecotoxicologia estuda a interação da química ambiental e a biota, sendo assim, este estudo teve como objetivo identificar alterações quantitativas de bile e glicogênio no fígado dos peixes, órgão responsável pelo processo de detoxificação, biotransformação e também pela reserva de nutrientes como o glicogênio e por secretar a bile. Os grupos foram separados em três tratamentos com o objetivo de comparar os danos causados aos peixes que vivem em áreas perturbadas, (como é o caso do Lago Azul – Rio Claro-SP), e os que vivem em águas com detergentes biodegradáveis diluídos, como na maioria dos nossos cursos d'água, comparados a um grupo controle (água clorada do poço artesiano da UNESP- Campus Rio Claro). Análises histológicas foram feitas com a utilização das técnicas de H-E e PAS, sendo o material coletado após sete e 20 dias de experimento, visando identificar os efeitos agudos de tais poluentes. A identificação de alterações na estrutura histológica foi realizada com o auxílio do programa ImageJ com o qual foi feita a quantificação da área ocupada pela bile e pelo glicogênio.

2. INTRODUÇÃO

2.1 Biologia de *Prochilodus lineatus*

As espécies da família Prochilodontidae (onde está incluído o gênero *Prochilodus*) possuem como características 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 (SILVA, 2006). O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região neotropical, e possui 13 espécies descritas até o momento. Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimatá (SILVA, 2006). A espécie *P. lineatus*, encontra-se amplamente distribuída em toda a bacia dos rios Paraná-Paraguai e no Rio Paraíba do Sul (na costa sudeste do Brasil).

O *Prochilodus lineatus* tem um ótimo potencial para a piscicultura por ter um baixo custo de produção, tornando-se uma alternativa economicamente atrativa, além de ser uma espécie tolerante a variações de pH (TAKASUSUKI *et al.*, 2004) e temperatura (BARRINUEVO & FERNANDES, 1995) da água. Segundo Jensch-Junior *et al.* (2005), *P. lineatus* é considerada a espécie mais importante de porte médio para a pesca comercial e de subsistência. Na bacia do rio Paraná ocorrem cardumes de 60 até 80.000 indivíduos (BARBIERI, SALLES & CESTAROLLI, 2000), o que mostra o valor potencial da espécie no estoque pesqueiro.

Devido a esse potencial econômico, amplo conhecimento da sua biologia como o hábito de se alimentar de detritos de fundos lamacentos, que podem estar contaminados com substâncias xenobióticas, e ser sensível a eles como mostram diversos estudos realizados com o fígado desta espécie, ela é considerada apropriada para testes de toxicidade (MADUENHO *et al.*, 2008; SIMONATO *et al.*, 2008; SPERANZA *et al.*, 2009; WINKALER *et al.*, 2007; TRONCOSO *et al.*, 2011).

2.2 A importância do fígado de peixes

Segundo Mumford *et al.* (2010) o fígado de peixes é um órgão relativamente grande. Em peixes selvagens, apresenta-se de cor marrom avermelhado em espécies carnívoras e marrom claro em herbívoros, mas em certos períodos do ano podem apresentar-se de colorações amareladas chegando até ao branco. Em animais de cativeiro, pode apresentar coloração mais clara do que espécies selvagens, mas isto dependerá da dieta empregada a estes animais.

Ainda de acordo com Mumford *et al.* (2010), a histologia do fígado difere daquela de mamíferos no que se refere a uma menor tendência na formação de cordões distintos ou de lobos, sendo que o sistema porta hepático em geral não é evidente. O fígado de peixes apresenta enzimas para a metabolização de drogas e é um dos órgãos que mais apresenta danos durante a vida do animal, entretanto foi mostrado que em mamíferos apenas 10% do parênquima hepático é necessário para a manutenção das funções básicas do fígado.

O fígado é um órgão muito irrigado, devido as suas funções de processar e armazenar os nutrientes absorvidos no trato digestivo e de neutralização, eliminação de substâncias tóxicas e de secreção da bile. Este órgão é composto basicamente por hepatócitos, que são células poliédricas, com seis ou mais superfícies (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004), além das células de Kupfer. Segundo Williams *et al.* (2002), para que ocorra a eliminação de compostos xenobióticos é necessário a biotransformação destes compostos lipofílicos em metabólitos hidrofílicos, favorecendo assim sua eliminação através da urina ou fezes.

Por ser o principal órgão responsável pelo processo de detoxificação de xenobióticos o fígado está sujeito a alterações, uma vez que este normalmente acumula concentrações mais elevadas de substâncias tóxicas (MADUENHO & MARTINEZ, 2008). A maioria das lesões morfológicas induzidas pelos contaminantes aquáticos é inespecífica, como é o caso da hiperplasia, contudo as células se mostram extremamente susceptíveis a elas (MEYERS & HENDRICKS, 1982).

Maduenho & Martinez (2008) em *P. lineatus*, foram identificados estágios de degeneração do fígado após a exposição dos animais a DFB (diflubenzuron), sendo que o estágio I foi caracterizado por apresentar agregados de melanomacrófagos, (com hipertrofia celular e nuclear) e núcleos dos hepatócitos deslocados para a periferia. O estágio II apresenta degeneração citoplasmática com vacuolização nuclear, estagnação biliar e núcleos picnóticos.

O estágio III foi caracterizado por alterações mais severas que causariam danos as funções do fígado.

Segundo Simonato *et al.* (2008), peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações em seu fígado como hipertrofia e deslocamento lateral do núcleo, vacuolização e degeneração do citoplasma, entre outras. Estudo recente de Simonato *et al.* (2011), também mostrou que peixes expostos a gasolina apresentavam defesas antioxidantes ativadas em órgãos específicos, sendo o fígado melhor adaptado para lidar com esse tipo de substância tóxica em comparação com as brânquias dos mesmos indivíduos.

Estudos toxicológicos realizados por Jiraungkooskul *et al.* (2002), com herbicidas, demonstraram a presença das mesmas lesões encontradas por Maduenho & Martinez (2008), assim como dilatação do espaço de Bowman'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.

Outros autores como Hued *et al.* (2012) realizaram estudos com peixes da espécie *Jenynsia multidentata* expostos ao herbicida glifosato (Roundup) em diferentes concentrações e observaram que os indivíduos apresentavam diminuição na atividade sexual, além de diversas alterações hepáticas sendo que estas alterações se apresentavam com maior frequência e gravidade com o aumento da concentração do herbicida.

De acordo com Stehr *et al.* (1997), peixes das espécies *Platichthys stellatus* e *Genyonemus lineatus* que foram coletados na Baía de San Francisco, que é uma região contaminada pelo acúmulo de resíduos agrícolas e pelo despejo de resíduos urbanos e indústrias, apresentavam alterações no tecido hepático tais como vacuolização hidrópica e diferenças nos níveis de bile.

Ao realizar um estudo com peixes da espécie *Cyprinus carpio* expostos a ambientes com a ocorrência de alachlor, um tipo de herbicida conhecido como LASSO MTX, Mikula *et al.* (2008) demonstraram que esta substância causa efeitos tóxicos nesses indivíduos, pois a mesma tinha a capacidade de ativação de enzimas desintoxicante como a EROD, evidência mencionada também no trabalho de Whyte *et al.* (2000) com a utilização de alguns praguicidas piretróides e organoclorados, e de estimular a defesa antioxidante de isoformas do citocromo P450 (CYP450) e de glutathione (GSH) presentes no fígado. Esta reação causada

por uma substância tóxica corrobora com o trabalho de Van der Oost *et al.*, (2003), em que consideram o aumento da atividade das enzimas do complexo do citocromo P450 como um dos sinais biológicos mais precoces da presença de poluentes indutores no ambiente aquático.

2.3 Detergentes biodegradáveis

Populações de peixes são sensíveis a impactos ambientais resultantes de diversos fatores, seja a introdução de espécies exóticas, presença de resíduos industriais, derramamento de óleo, de pesticidas ou de outros agentes, que possam 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 na velocidade de crescimento e reprodução das algas e ervas daninhas. Este processo é 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).

2.4 Caracterização do Lago Azul

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

O córrego 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 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 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.

2.5 Ecotoxicologia e a sua importância

Ecotoxicologia possui duas linhas de pesquisa, uma envolvendo a toxicologia e a outra envolvendo a ecologia aplicada e a química ambiental. Ela estuda as interações da química ambiental e a biota e tem como foco os efeitos adversos encontrados nos diferentes níveis de organização biológica, desde níveis mais simples como a molécula, célula, tecido, órgão, até níveis mais complexos como organismos, populações e ecossistemas. Os efeitos tóxicos de compostos antropogênicos na biota e em ecossistemas são investigados numa conexão próxima com a química ambiental e o destino desses produtos químicos, incluindo sua disponibilidade natural. Ela busca a compreensão de fenômenos toxicológicos em uma variedade de organismos e ecossistemas, levando em consideração diversos aspectos, tais como os mecanismos de ação tóxica e os processos ecológicos de áreas contaminadas (FENT, 1996).

Os estudos toxicológicos quando realizados juntamente com análises químicas ajudam a identificar os efeitos causados em organismos expostos a ambientes degradados e a estabelecer a conexão do agente causador com o resíduo químico encontrado na amostra. Uma das estratégias para avaliar os efeitos potenciais da contaminação é a utilização de biomarcadores em pesquisas ecológicas para verificar a presença de concentrações de

poluentes na biota (BUCHELI & FENT, 1996). Este termo, que designa espécies que sinalizam as mudanças ambientais através de alterações fisiológicas, bioquímicas e patológicas, foi descrito em 1987 pelo *Committee on Biological Markers of the National Research Council* (NRC) (SCHLENK, 1999).

De acordo com Van der Oost *et al.* (2003), pode-se dividir as técnicas de avaliação da contaminação ambiental utilizando biomarcadores em duas metodologias principais: aquelas associadas aos níveis de organização, como população, comunidade e ecossistema; e em nível individual, abordando alterações fisiológicas, comportamentais e reprodutivas.

Segundo Olson *et al.* (2000), a utilização de espécies biomarcadoras para a avaliação de segurança de substâncias químicas tanto medicinais quanto não medicinais tem sido de grande auxílio na previsão de possíveis efeitos tóxicos para os seres humanos.

Sendo assim, os peixes podem ser utilizados para determinar a genotoxicidade de poluentes presentes na água. Em ecossistemas aquáticos, os poluentes se acumulam nos sedimentos e são passados a diante na cadeia alimentar. Os peixes estão no topo da cadeia alimentar e podem acumular uma variedade de contaminantes através da respiração ou pela ingestão de espécies pequenas. Muitas espécies de peixes e crustáceos são utilizadas na alimentação humana, tornando-se o destinatário final desses poluentes (TREMP *et al.* 1995).

Diversos estudos utilizam peixes como ferramenta para monitoramento da qualidade ambiental, como Lukin *et al.* (2011); Mortensen *et al.* (2011); Brito *et al.* (2012); Lozano *et al.* (2012); Paulo *et al.* (2012). Assim o entendimento das ações de poluentes em peixes auxilia a avaliação do estado de degradação dos ambientes aquáticos e também podem desempenhar um papel importante no alerta a possíveis impactos na saúde humana.

2.6 Justificativa

Segundo Bols *et al.* (2001) e Bols *et al.* (2005) na perspectiva da ecotoxicologia, os peixes são especialmente importantes. Com aproximadamente 20.000 espécies diferentes ocupando todos os nichos aquáticos, os peixes são o grupo de vertebrados mais diversificados. Assim o entendimento das ações de poluentes em peixes auxilia na avaliação do estado de degradação dos ambientes aquáticos. Os efeitos de poluentes em peixes também são importantes para a previsão de possíveis impactos na saúde humana.

Agentes tóxicos são usualmente liberados primeiramente em ambientes aquáticos, por diversas vias, nas quais humanos podem ser expostos. Como diversos sistemas biológicos têm sido preservados através da evolução, efeitos em peixes podem servir como um alerta para futuros impactos na saúde humana.

Nesta mesma linha, peixes podem servir como modelos laboratoriais para estudos ecotoxicológicos, visando sua importância econômica. Para a indústria da pesca, não só a saúde de determinadas espécies alvo é de extrema importância, mas também a manutenção das demais espécies é considerada crítica para a manutenção de cardumes pesqueiros. No presente trabalho a espécie escolhida possui importância para a pesca econômica como também para a pesca esportiva.

3. OBJETIVOS

A espécie *Prochilodus lineatus* foi escolhida por habitar os rios da região neotropical, que sofrem com o despejo de poluentes semelhantes aos que foram utilizados neste trabalho.

Neste sentido os objetivos deste trabalho foram:

- Quantificar e verificar a elevação ou diminuição de bile presente no tecido hepático, através da quantificação da área total ocupada por ela no tecido;
- Verificar possíveis alterações nas reservas de glicogênio, calculando a área total ocupada por este composto.

4. MATERIAL

Para a realização deste experimento foram coletados 36 indivíduos da espécie *Prochilodus lineatus* no ICMBio/CEPTA – Pirassununga, São Paulo, Brasil. Os peixes foram mantidos em três caixas de polietileno com capacidade para 500 litros cada, com temperatura constante de 25⁰C, areadas constantemente (Figura 4.1), que receberam amostras de água de dois tratamentos e do controle. Tratamento 1: amostra de água coletada no Lago Azul (Rio Claro- São Paulo); tratamento 2: água tratada com dez amostras de detergentes biodegradáveis de diversas marcas na concentração de 1:1000000 e controle: água comprovadamente limpa e clorada coletada do poço artesiano da UNESP - Campus Rio Claro.

Para análises histológicas foram utilizados microscópio Leica DM2000 provido de câmera para captura de imagens DMLB Leica com o auxílio do software Leica QWIN, as quais foram analisadas pelo programa ImageJ.



Figura 4.1: Estrutura montada na UNESP – Campus de Rio Claro, contendo caixas de polietileno de 500L, nas quais parte do experimento foi realizado.

5. METODOLOGIA

Os espécimes foram divididos em três grupos de 12 indivíduos cada, descritos acima, e cada grupo foi estocado em uma das caixas de 500 litros, sendo que o grupo Controle ficou exposto à água pura do poço artesiano da UNESP, que recebe tratamento com cloro para evitar possíveis contaminações, sendo a única água disponível no campus pra o experimento. Entretanto a água foi oxigenada por uma semana antes do experimento para baixar os níveis de cloro. O segundo grupo ficou exposto à água contendo uma mistura de dez marcas de detergentes biodegradáveis (Limpol, Ypê, Minuano, Qualitá, Amazon, Ariel, Colmax, Alpes, Lipon e Surf) em uma diluição de 1ppm, visando detectar alterações histológicas em níveis baixos de agentes poluentes e o terceiro grupo ficou exposto a água do Lago Azul.

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. Nesse sentido, o presente estudo utilizou uma diluição de 1ppm, pois visava detectar alterações histológicas já com níveis baixíssimos de agentes poluentes, tendo em vista que a diluição de detergentes em rios, não deve exceder este valor. Esta concentração foi mensurada, pois nenhum órgão de fiscalização e controle de águas possui dados relativos aos níveis detergentes tanto em lagos, quanto em rios, com isso como Roy (1988) descreveu que em seu trabalho, a água imediatamente próxima aos locais de descarte de resíduos urbanos, apresenta uma concentração que não atinge os valores mínimos da DL50, acreditamos que no corpo de água a concentração não deve ultrapassar a concentração testada.

O material para análise foi coletado após os períodos de exposição de 7 e 20 dias, para tanto, os animais foram anestesiados em solução de benzocaína (0,1g de benzocaína em 1mL de álcool etílico para cada 100 mL de água deionizada) e fragmentos do órgão foram extraídos, fixados em Bouin aquoso e preparados para as reações de H-E, PAS em historesina segundo Paulete & Beçak (1976). Para a realização de todas as técnicas foram utilizados seis indivíduos de cada grupo, e as imagens obtidas no aumento de 400x foram analisadas com o auxílio do software ImageJ. Os protocolos de histologia e histoquímica estão descritos no item 5.3.

5.1 Análise quantitativa da área ocupada pela bile

Neste caso cinco secções de cada indivíduo a ser analisado foram submetidas à técnica de H-E e em cada corte cinco campos foram analisados, sempre próximos aos ductos biliares, no aumento de 400x. Neste caso a bile foi isolada computadoramente pelo ImageJ e sua área total foi calculada. Os dados de área gerados pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioStat 2009. Primeiramente os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos grupos e posteriormente ao teste ANOVA/Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis/Dunn, para dados não paramétricos, para determinar a significâncias dos resultados.

5.2 Análise quantitativa da área total ocupada pelo glicogênio

Para a análise do glicogênio, cinco secções de cada indivíduo foram analisadas após a reação de PAS, nos quais cinco campos foram fotografados e analisados em cada corte, sempre distantes de grandes vasos, para que o maior número de hepatócitos possíveis fosse analisado. Os dados da área ocupada pelo glicogênio obtidos pelo programa foram tabelados e analisados estatisticamente pelo programa BioStat 2009. Primeiramente os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos grupos e posteriormente ao teste ANOVA/Tukey, para dados paramétricos, e Kruskal-Wallis/Dunn, para dados não paramétricos, para determinar a significâncias dos resultados.

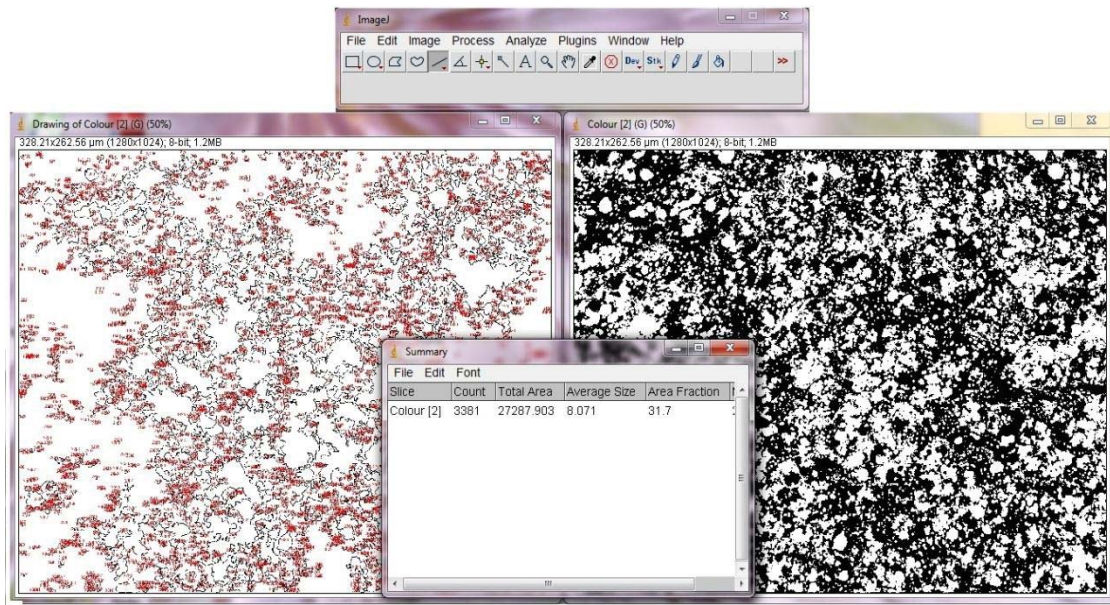


Figura 5.1 - Programa ImageJ versão 1.44e, realizando a análise da área ocupada pelo glicogênio. Esta mesma metodologia foi empregada para a quantificação da bile.

5.3 Protocolos de histologia e histoquímica

- Hematoxilina e Eosina: 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. Para a realização desta técnica as lâminas foram deixadas em água destilada por 1 min, coradas com hematoxilina por 5min, reagiram com água por 4min, foram lavadas em água corrente, coradas com eosina por 5min e lavadas em água corrente.

- PAS (Ácido Periódico de Schiff): Segundo Paulete & Beçak (1976) o ácido periódico quando atua nos polissacarídeos, oxida-os, dando lugar à formação de aldeídos, os quais podem ser detectados pelo reativo de Schiff. Para a realização desta técnica as lâminas foram deixadas em ácido periódico 0,4% por 10min, lavadas em água destilada, reagiram com o reativo de Schiff por 1h no escuro, lavadas em água sulforosa (3 banhos de 1min. cada), lavadas em água corrente por 10min.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos pela análise da área total ocupada pela bile são apresentados nas tabelas 6.1 e 6.2 e nas figuras 6.1 e 6.2, nos quais foi evidenciado que em sete dias de experimento ocorreu diferença significativa entre os grupos controle e detergente quando comparados com o Lago Azul, com $p < 0.05$. Após 20 dias de experimento observou-se diferença significativa, com $p < 0.05$, apenas quando comparados os grupos controle e Lago Azul; detergente, não revelou diferença significativa quando comparado com os outros dois grupos.

Tabela 6.1: Média das áreas em μm^2 ocupadas pela bile no período de sete dias, calculadas sob objetiva de 40x.

Espécime	Controle	Detergente	Lago Azul
1	24103	23655	5318
2	23401	20354	3296
3	20838	17773	4634
4	25338	21308	1828
5	17507	13270	2719
6	17341	22800	8845

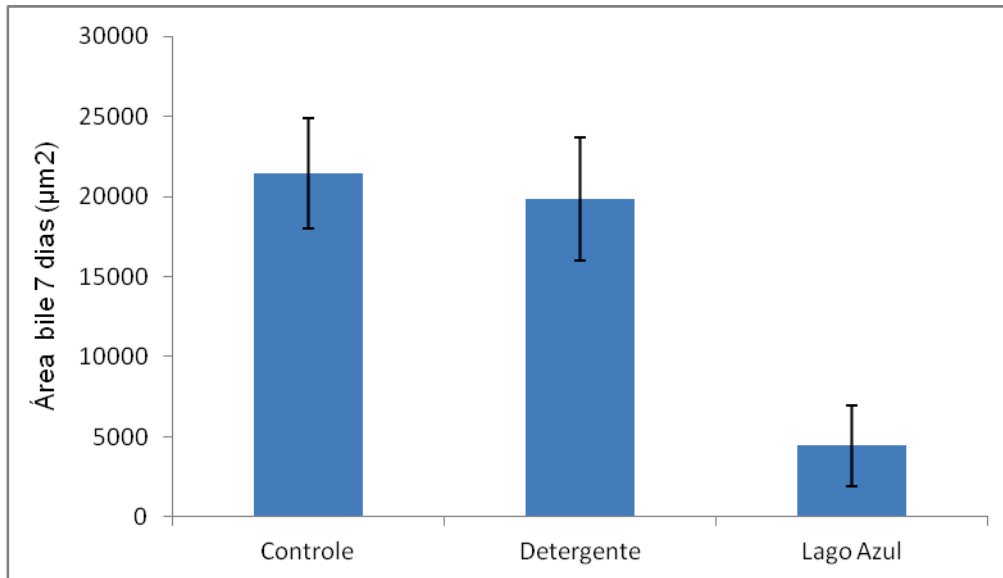


Figura 6.1: Média das áreas em μm^2 ocupadas pela bile no período de sete dias dos tratamentos com desvio padrão.

Tabela 6.2: Média das áreas em μm^2 ocupadas pela bile no período de 20 dias, calculadas sob objetiva de 40x.

Espécime	Controle	Detergente	Lago Azul
1	16921	11161	1217
2	16954	15394	831
3	21445	6403	2392
4	13210	13083	8731
5	22876	14395	6968
6	25645	7364	7878

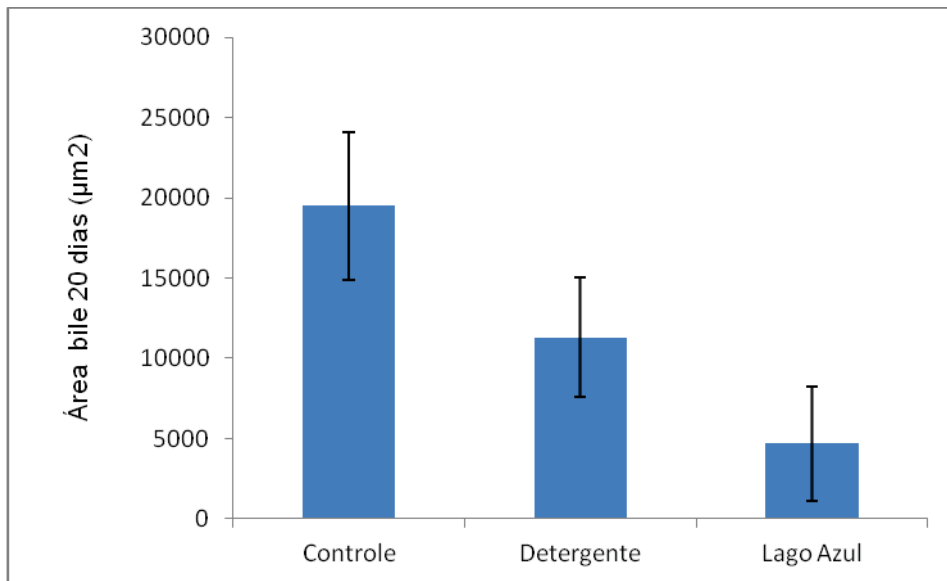


Figura 6.2: Média das áreas em μm^2 ocupadas pela bile no período de 20 dias dos tratamentos com desvio padrão.

Com o auxílio das tabelas 6.3 e 6.4 e das figuras 6.3 e 6.4, podemos observar que os indivíduos do grupo Lago Azul de sete e 20 dias possuem menos glicogênio armazenado quando comparada com os indivíduos dos outros grupos. A análise estatística demonstra essa diferença entre os grupos controle e Lago Azul de sete e 20 dias, com $p < 0,05$, e também entre detergente e Lago Azul de sete dias.

Tabela 6.3: Média da área em μm^2 ocupada pelo glicogênio no período de sete dias, calculados sob objetiva de 40x.

Espécime	Controle	Detergente	Lago Azul
1	47008	30546	15877
2	45759	33563	20651
3	45291	33926	18567
4	47735	35739	20110
5	47607	27342	15613
6	46479	32403	15305

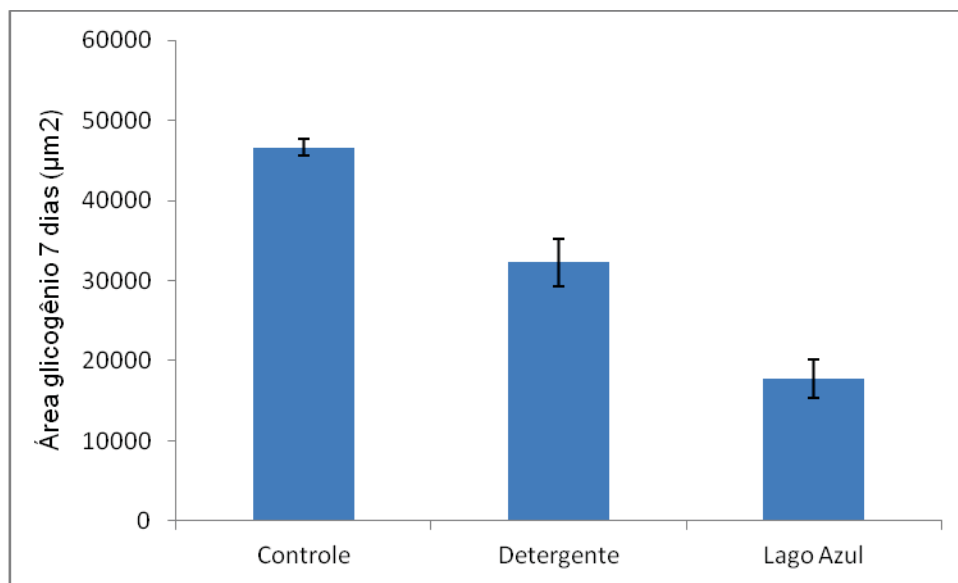


Figura 6.3: Média das áreas em μm^2 ocupadas pelo glicogênio no período de sete dias dos tratamentos com desvio padrão.

Tabela 6.4: Média da área em μm^2 ocupada pelo glicogênio no período de 20 dias, calculados sob objetiva de 40x.

Espécime	Controle	Detergente	Lago Azul
1	46057	29016	8531
2	46280	22454	12723
3	45235	23280	10507
4	47563	24462	11809
5	49978	15972	9229
6	50573	20676	8064

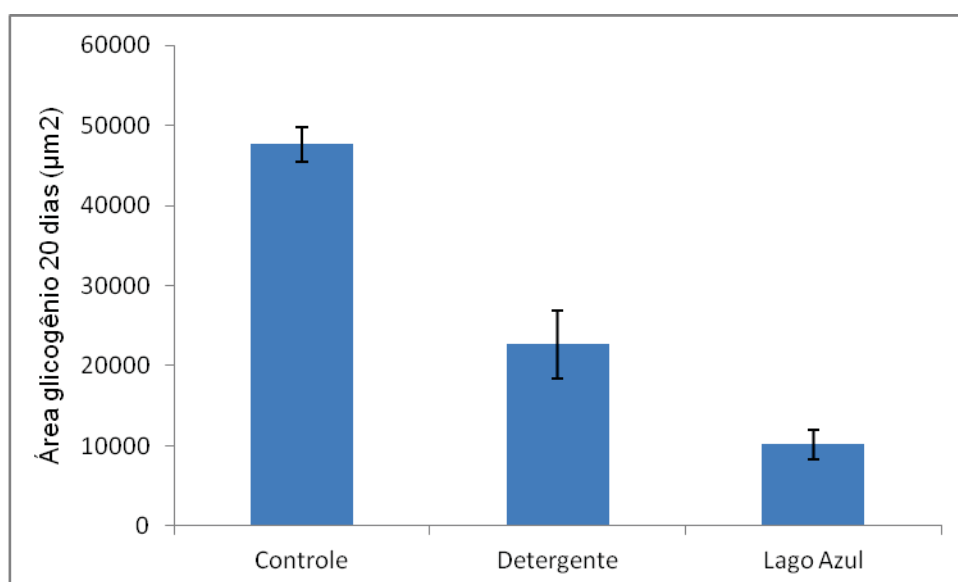


Figura 6.4: Média das áreas em μm^2 ocupadas pelo glicogênio no período de 20 dias dos tratamentos com desvio padrão.

No grupo detergente (Figura 6.5- C e D) de sete e 20 dias notou-se o aparecimento de vacuolização citoplasmática, entretanto no de 20 dias observou-se, além disto, a diminuição da bile em comparação com o grupo controle (Figura 6.5-A e B). No grupo Lago Azul (Figura 6.5- E) de sete dias notaram-se danos hepáticos semelhantes ao grupo detergente de 20 dias, mas uma redução mais evidente da bile; já com o grupo Lago Azul (Figura 6.5- F) com 20 dias, ocorreu significativo aumento da vacuolização e diminuição da bile.

No caso da quantificação de grânulos de glicogênio, a análise não pôde ser realizada, pois principalmente o grupo controle, possuía diversos grânulos pequenos de glicogênio que não puderam ser isolados pelo programa, inabilitando assim tal análise. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição a poluentes pode gerar danos graves tanto ao tecido hepático quanto ao restante dos órgãos, tendo em vista que diminui sua capacidade de reserva da principal fonte de energia para o organismo, o glicogênio.

Como podemos observar (Figura 6.6-D), o grupo detergente de 20 dias apresentou diminuição significativa nos grânulos de glicogênio quando comparado com o detergente de sete dias e com o grupo controle (Figura 6.6-C e A, respectivamente), além de apresentar também o início de vacuolização citoplasmática. Já no grupo Lago Azul (Figura 6.6- E e F), podemos notar que a vacuolização chegou ao nível mais elevado quando comparado com os grupos detergente de sete dias (Figura 6.6-C) e 20 dias (Figura 6.6-D) e Lago Azul de sete dias (Figura 6.6-E), podemos também notar com o auxílio das tabelas 6.3 e 6.4 e das figuras 6.3 e 6.4, que os indivíduos do grupo Lago Azul de sete e 20 dias possuem menos glicogênio armazenado quando comparados com os indivíduos dos outros grupos.

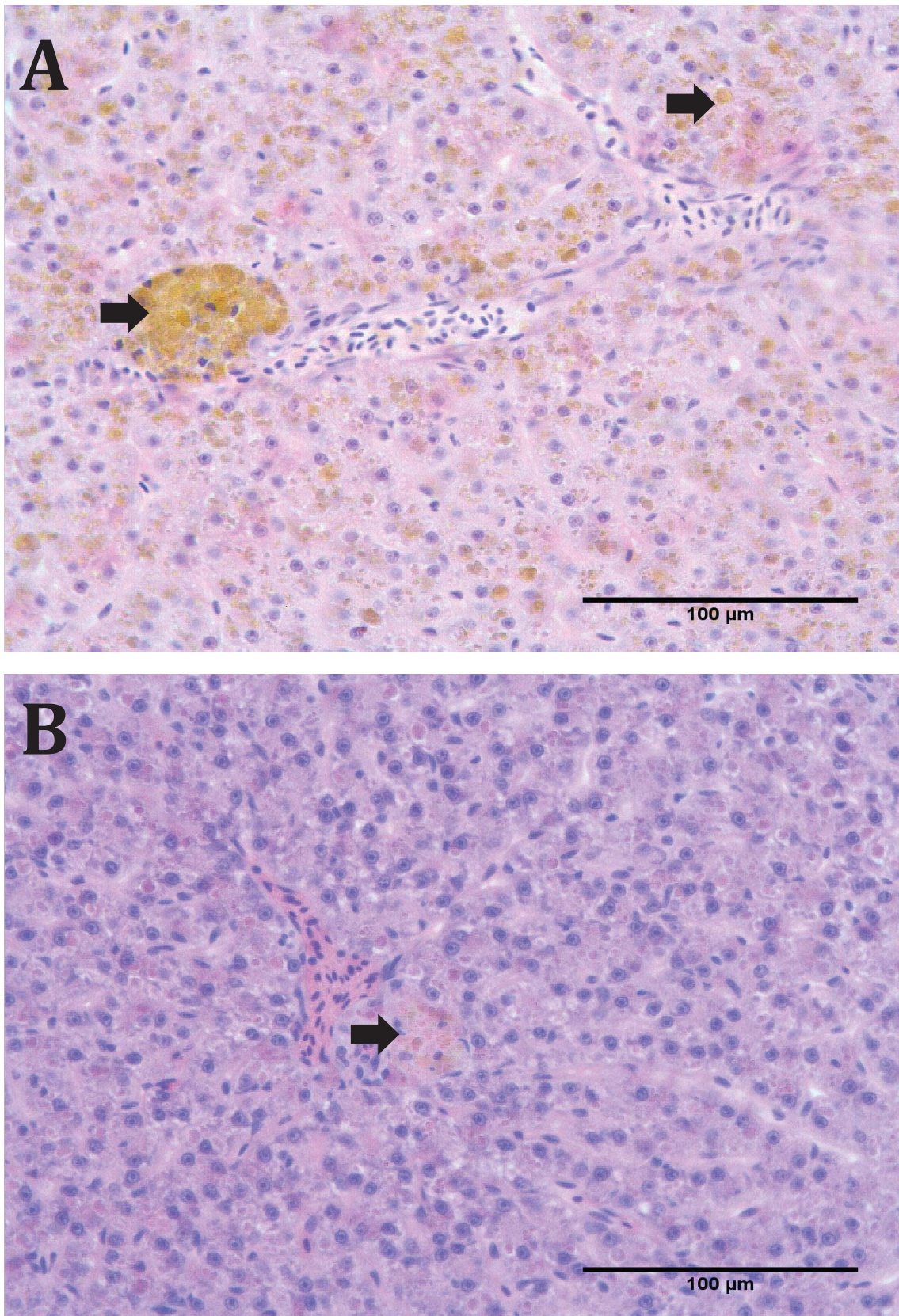


Figura 6.5- A e B: Grupo controle em sete e 20 dias de experimento, respectivamente, nos quais observa-se tecido hepático íntegro, bem como grânulos de bile (setas). Coloração H-E.

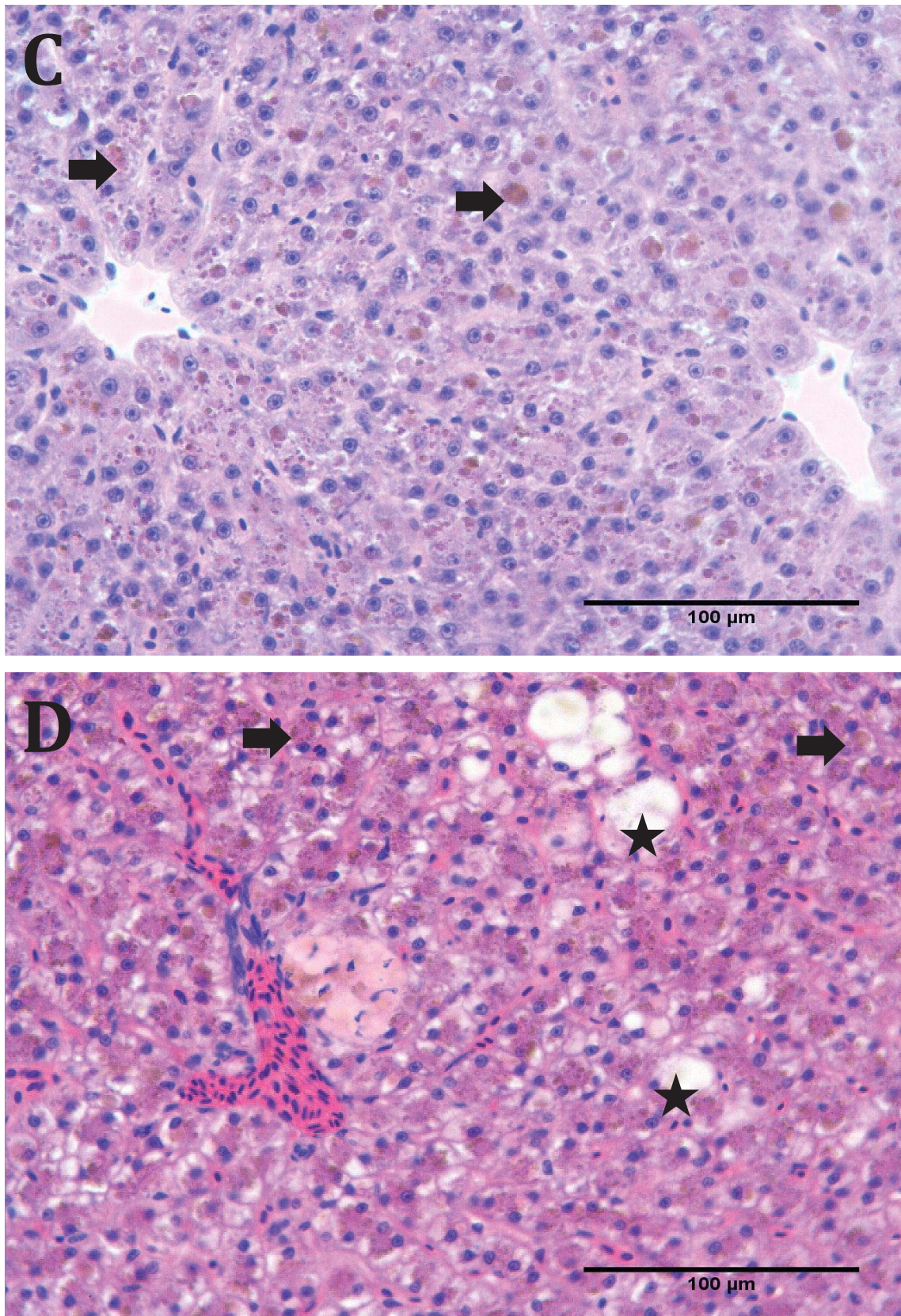


Figura 6.5- C: Grupo exposto ao detergente por sete dias com grânulos de bile (setas) ; D: Após 20 dias de experimento, observa-se o aparecimento de vacuolização nos hepatócitos (estrelas) e a diminuição nos grânulos de bile (setas) do tecido. Coloração H-E.

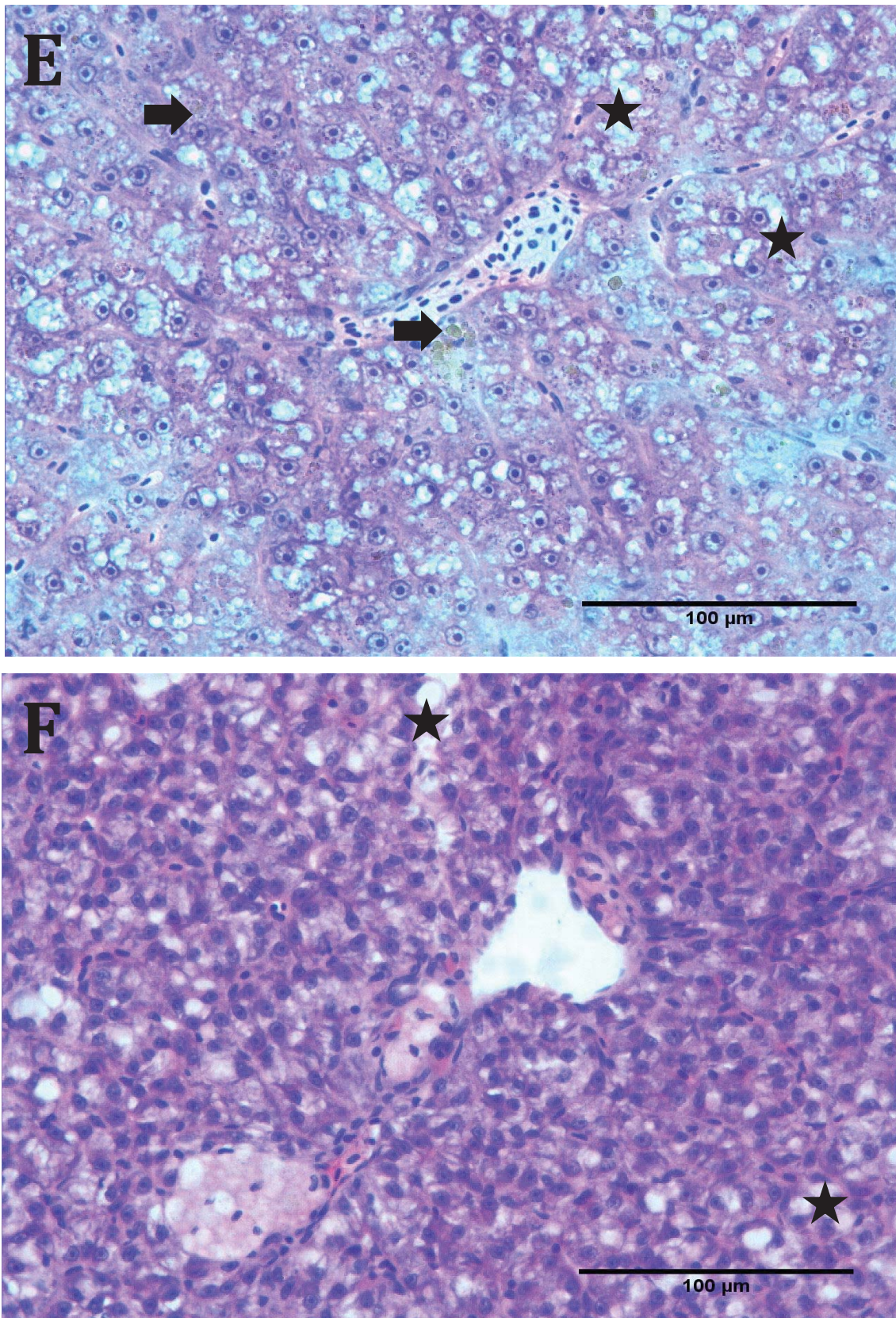


Figura 6.5- E e F (sete e 20 dias respectivamente) cortes do fígado dos indivíduos expostos a água do Lago Azul, evidenciando hepatócitos vacuolizados no grupo de 20 dias (estrelas) e redução significativa dos grânulos de bile, tanto no grupo de sete quanto o de 20 dias. Coloração H-E.

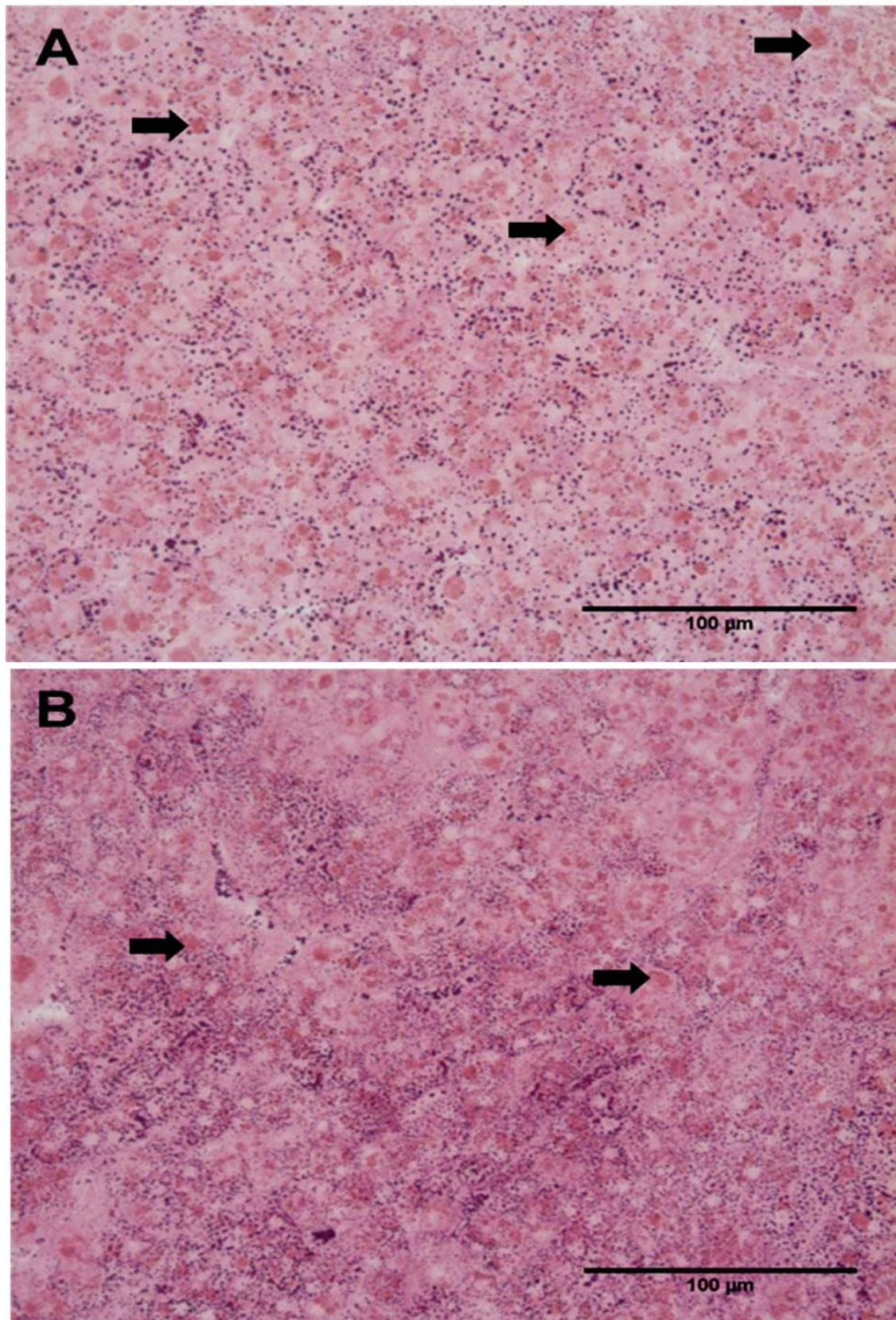


Figura 6.6- A e B - Grupo controle em sete e 20 dias de experimento, respectivamente, nos quais observa-se tecido hepático íntegro, bem como a reserva de glicogênio (setas). Coloração PAS.

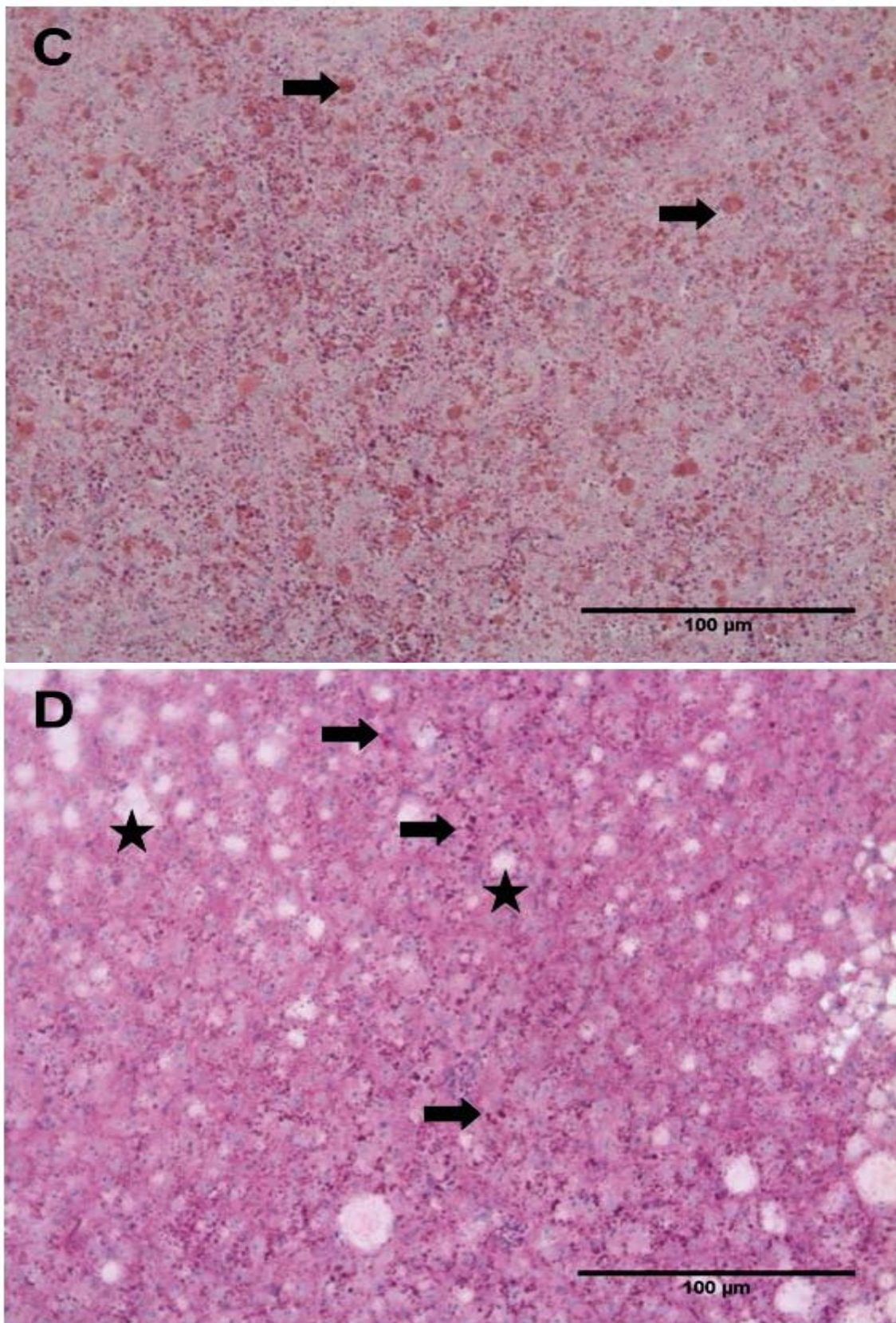


Figura 6.6- C: Grupo exposto ao detergente por sete dias com reserva de glicogênio (setas) ; D: Após 20 dias de experimento, observa-se o aparecimento de vacuolização nos hepatócitos (estrelas) e a diminuição nos grânulos de glicogênio (setas) do tecido. Coloração PAS.

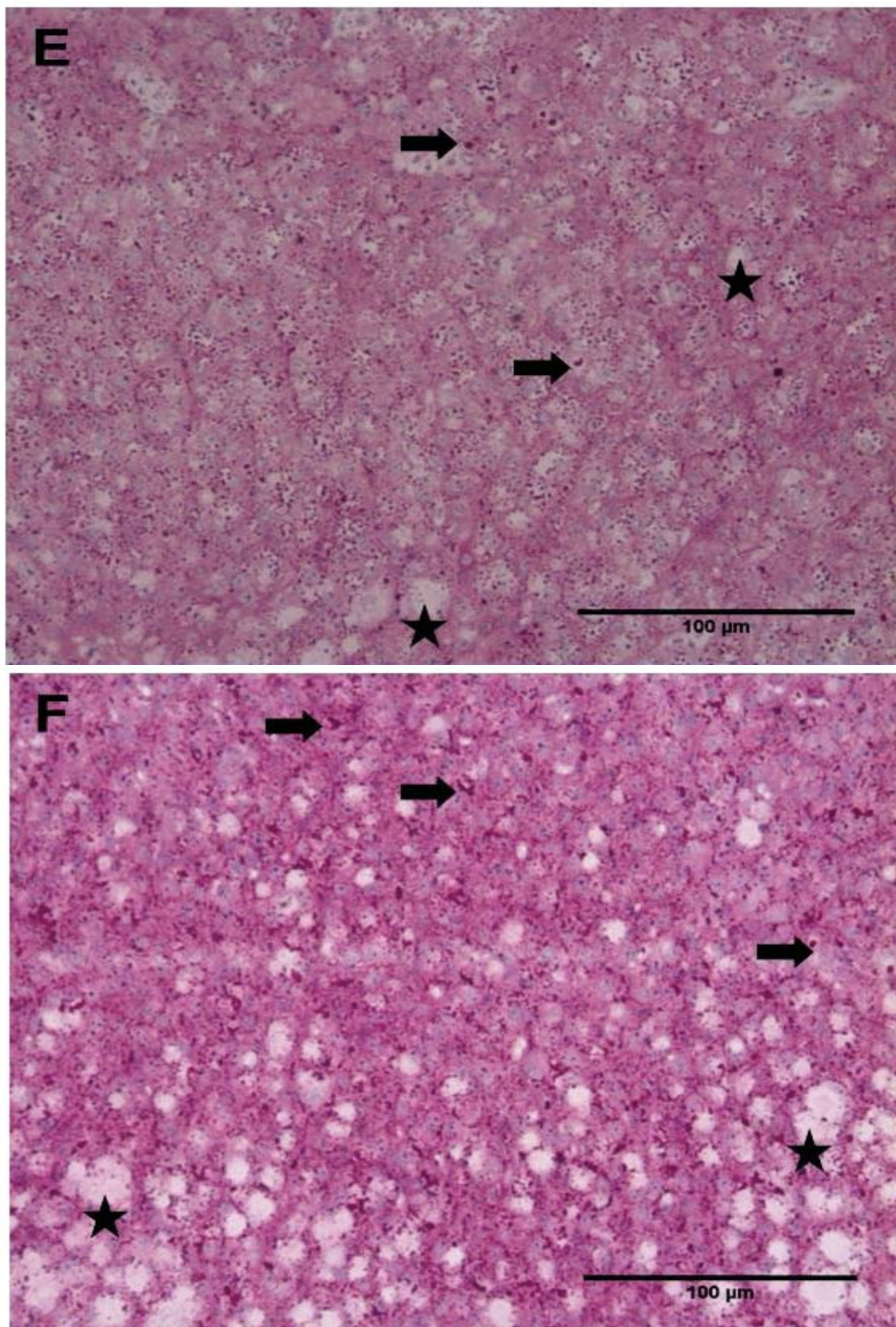


Figura 6.6- E e F (sete e 20 dias respectivamente) cortes do fígado dos indivíduos expostos a água do Lago Azul, evidenciando um grande número de hepatócitos vacuolizados no grupo de 20 dias (estrelas) e redução significativa dos grânulos de glicogênio, tanto no grupo de sete quanto o de 20 dias. Coloração PAS.

7. DISCUSSÃO

Diversos estudos citados anteriormente utilizam peixes como bioindicadores para o monitoramento da qualidade da água e conseqüentemente tem como objetivo identificar os tipos de lesões causadas por estas substâncias tóxicas em diversos órgãos. Este trabalho utilizou como ferramenta para essa análise as alterações no tecido hepático, pois este é o principal órgão afetado por essas substâncias devido a sua função de metabolizar e biotransformar xenobióticos.

No presente estudo observamos diversas alterações hepáticas, mas não pudemos classificá-las histologicamente nos três estágios utilizados por Maduenho & Martinez (2008), pois notamos características de mais de um estágio no mesmo período de exposição, como é o caso do grupo detergente de 20 dias, que apresenta núcleos deslocados para a periferia assim como vacuolização citoplasmática e diminuição do armazenamento do glicogênio. Segundo Simonato *et al.* (2008), peixes expostos a poluentes como petróleo, por exemplo, podem apresentar modificações em seu fígado como hipertrofia e deslocamento lateral do núcleo, vacuolização e degeneração do citoplasma, entre outras, portanto muito semelhante ao observado.

Esse tipo de degeneração citoplasmática está presente nos grupos detergente e Lago Azul, mas encontra-se em nível mais elevado no grupo Lago Azul de 20 dias quando comparado com os grupos detergente de sete dias e 20 dias e Lago Azul de sete dias, indicando que a contaminação por detergente pode ser menos agressiva do que a água do Lago Azul. Essa característica corrobora com os resultados obtidos nos estudos de Agamy (2012), em que essa vacuolização pode ser associada com a perda da estrutura dos microtúbulos, inibição da síntese de proteínas, diminuição de energia ou mudança de substrato utilizado pelos peixes.

De acordo com Stehr *et al.* (1997), peixes das espécies *Platichthys stellatus* e *Genyonemus lineatus* que foram coletados na Baía de San Francisco, que é uma região contaminada pela acumulação de resíduos agrícolas e pelo despejo de resíduos urbanos e indústrias, apresentavam alterações no tecido hepático como vacuolização hidrópica e diferenças nos níveis de bile, resultado semelhante ao encontrado nos nossos indivíduos, demonstrando que além de ocorrer a estagnação biliar ocorre também decréscimo na área ocupada pela bile no grupo Lago Azul de sete e 20 dias, indicando que essas alterações

ocorrem devido ao fato da contaminação da água do Lago Azul ser mais agressiva que o tratamento com detergente.

Em estudo de toxicologia semelhante aos citados anteriormente, Aguiar *et al.* (2004) demonstraram que em *Anguilla anguilla*, o fenitrothion, causou redução do nível de glicogênio no fígado. Segundo Wolf e Wolfe (2005), a diminuição dos níveis de glicogênio no tecido hepático pode ser resultado da destruição dessas células além de indicar um alto gasto energético para a defesa antioxidante. Utilizando peixes das espécies *Acipenser transmontanus* e *Acipenser medirostris*, Lee *et al.* (2012), observaram que as principais alterações histológicas encontradas no fígado desses indivíduos foram degeneração vacuolar e diminuição do glicogênio, assim como Saravanan *et al.* (2011) também observaram nos peixes da espécie *Cyprinus carpio* expostos ao pesticida lindano.

A diminuição no nível de glicogênio no fígado pode ser resposta do indivíduo ao ambiente poluído, levando-o a uma situação de estresse o que pode representar uma maior demanda energética para lidar com essa situação ou a demanda energética gasta para reparar os danos causados ao próprio tecido, assim como, também pode representar uma dificuldade de armazenar os seus nutrientes, como também pode ser observado com a diminuição do nível de bile, devido aos danos causados na estrutura da célula (KUBRAK *et al.* 2012).

Lee *et al.* (2012) também demonstraram que as alterações histológicas progrediam em gravidade com o aumento da concentração e período de exposição a substâncias tóxicas, como é o caso do metilmercúrio encontrado na Baía de São Francisco. No nosso estudo o grupo detergente de 20 dias apresentou diminuição significativa na concentração de glicogênio quando comparado com o detergente de sete dias e com o grupo controle do mesmo período. Já no grupo Lago Azul, podemos notar que este possui a menor área de glicogênio armazenada quando comparado com os indivíduos dos outros grupos dos mesmos períodos, corroborando a ideia de que as alterações podem se agravar com o aumento do período de exposição e também com o tipo de contaminação, padrão também observado por Ordonez *et al.* (2011) e Hued *et al.* (2012).

8. CONCLUSÃO

O presente trabalho evidenciou a diminuição na concentração de bile e glicogênio no tecido hepático em peixes da espécie *P. lineatus*, o que demonstra que as células expostas aos poluentes perderam sua função de produzir esta secreção e armazenar nutrientes. Estes danos causados por substâncias tóxicas afetam o processo digestivo e a reserva nutricional desses indivíduos. Também observamos que os animais expostos à água do Lago Azul tiveram alterações mais severas quando comparados com os animais do tratamento com detergente e que estas se agravavam também com o aumento do período de exposição. Isto pode levar a suspeitar que outros tecidos possam também estar sofrendo o mesmo processo, mas de uma maneira mais lenta.

Esse estudo mostrou-se de grande importância para a sociedade, devido ao fato de envolver uma área urbana impactada, como o Lago Azul, e por analisar os efeitos de poluentes comuns no meio ambiente, como os detergentes biodegradáveis. Além disto, trouxe inovações na linha de ecotoxicologia de peixes, tendo em vista que é o primeiro que aborda análises quantitativas de bile e glicogênio, substâncias importantes para o processo de digestão e reserva de nutrientes dos peixes. Isto possibilitará um melhor entendimento dos reais efeitos de poluentes nestes animais e abrirá uma nova gama de possíveis bioindicadores a serem analisados e quantificados.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAMY E. Histopathological liver alterations in juvenile rabbit fish (*Siganus canaliculatus*) exposed to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol 75, p 171–179, 2012.

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

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.

BARBIERI, G., SALLES, FA., CESTAROLLI, MA. Análise populacional do curimatá, *Prochilodus lineatus*, do rio Mogi Guaçu, Pirassununga/SP (Characiformes, Prochilodontidae). Boletim do Instituto de Pesca, vol. 26, no. 2, p. 137-145,2000.

BARRINUEVO,W.R., FERNANDES, M.N. Critical thermal maxima and mínima for curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner) of two different sizes. Aquaculture Research. Vol .26, p.447–450, 1995.

BOLS, N.C.; DAYEH, V.R.; LEE, L.E.J.; SCHIRMER, K.. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, vol. 6, 2005.

BOLS, N.C.; J.L. BRUBACHER, R.C.; GANASSIN AND L.E.J. LEE. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Developmental and Comparative Immunology. Vol. 25, p 853-873, 2001.

BRITO,I. A.; FREIRE, C. A.; YAMAMOTO, F. Y.; ASSIS, H.C.S.; SOUZA-BASTOS,L.R.; CESTARI, M.M.; GHISI,N.C.; PRODOCIMO,V.; NETO, F.F.; RIBEIRO, C.A.O. Monitoring water quality in reservoirs for human supply through multi-biomarker evaluation in tropical fish. Journal of Environmental Monitoring. Vol.14, p 615-625, 2012.

BUCHELI, T.D., FENT, K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. Critical Reviews in Environmental Science and Technology. Vol. 25, p 201–268, 1996.

DE 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, p. 67-86, 1993.

FENT, K.. Ecotoxicology of organotin compounds. Critical Reviews in Toxicology. Vol.26, p 11–17,1996.

HUED, A. C.; OBERHOFER, S.; BISTONI, M. A. Exposure to a Commercial Glyphosate Formulation (Roundup) Alters Normal Gill and Liver Histology and Affects Male Sexual Activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). Archives of Environmental Contamination and Toxicology . vol.62, p107–117,2012.

JENSCH-JUNIOR, B.E., PRESSINOTTI, N., BORGES, J.C.S., SILVA, J.R.M.C.,. Characterization of macrophage phagocytosis of the tropical fish *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881). Aquaculture . vol. 251, p.509–515, 2005.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM,S.; KRUATRACHUE,M.; SAHAPHONG,S.; GRAMS, S. V.; POKETHITIYOOK, P. Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science 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.

KUBRAK,O.I.; ROVENKO, B.M.; HUSAK, V.V.; STOREY,J.M.STOREY,K.B.; LUSHCHAK,V.I. Nickel induces hyperglycemia and glycogenolysis and affects the antioxidante system in liver and white muscle of goldfish *Carassius auratus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 80, p 231-237,2012.

LEE,J.W.; RIU, N. DE; LEE,S.; BAIC,S.C.;MONIELLO,G.; HUNG, S. S.O. Effects of dietary methylmercury on growth performance and tissue burden in juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*A. transmontanus*) . Aquatic Toxicology. Vol. 105,p 227–234, 2012.

LOZANO,N.; RICE, C. P.; PAGANO, J.; ZINTEK, L.; BARBER, L.B.; MURPHY, E. W.; NETTESHEIM, T.; MINARIK ,T.; SCHOENFUSS, H.L. Concentration of organic contaminants in fish and their biological effects in a wastewater-dominated urban stream. Science of the Total Environment. Vol. 420, p 191–201, 2012.

LUKIN, A.; SHAROVA ,J.; BELICHEVA, L.; CAMUS, L. Assessment of fish health status in the Pechora River: Effects of contamination. Ecotoxicology and Environmental Safety . vol 74, p 355–365, 2011

MADUENHO, L.P.; MARTINEZ, C.B.R.. Acute Effects of Diflubenzuron on the Neotropical Freshwater Fish *Prochilodus lineatus* .Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 148, p 265–272, 2008.

MEYERS, T.R.; HENDRICKS, J.D. A summary of tissue lesions in aquatic animals induced by controlled exposures to environmental contaminants, chemotherapeutic agents, and potential carcinogens. Marine Fisheries Review, v. 44, n. 12, p. 1-17, 1982.

MIKULA P., BLAHOVA J., KRUIKOVA K., HAVELKOVA M., NEMETHOVA D., HULAK M., SVOBODOVA Z. Effects of the herbicide LASSO MTX (alachlor 42% W/V) on biometric parameters and liver biomarkers in the common carp (*Cyprinus carpio*). Pesticide Biochemistry and Physiology . vol. 93, p 13-17, 2008.

MORTENSEN, A. S.; LETCHER, R. J.; CANGIALOSI, M.V.; CHU, S.; ARUKWE, A. Tissue bioaccumulation patterns, xenobiotic biotransformation and steroid hormone levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a diet containing perfluoroactane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids. Chemosphere. Vol 83, p 1035–1044, 2011.

MUMFORD S.; HEIDEL, J.; SMITH, C.; MORRISON, J; MACCONNELL, B.; BLAZER, V. Fish Histology and Histopathology. Shepherdstown, West Virginia – United States of America, National Conservation Training Center, 357p, 2010.

OLSON H, BETTON G, ROBINSON D, THOMAS K, MONRO A, KOLAJA G, LILLY P, SANDERS J, SIPES G, BRACKEN W, DORATO M, VAN DENN K, SMITH P, BERGER B, HELLER A. Concordance of the toxicity of pharmaceutical s in humans and in animals. Regulatory Toxicology and Pharmacology. Vol. 32,p 56–67,2000.

ORDONEZ E., O.; GALICIA E., U.; PICOS R., A., R.; DURAN A., G., S.; TREJO Y., H.; DÍAZ J., E., S.; LÓPEZ E., L. Effect of Yerbimat Herbicide on Lipid Peroxidation, Catalase Activity, and Histological Damage in Gills and Liver of the Freshwater Fish *Goodea Atripinnis*. Archives Environmental Contamination Toxicology. vol. 61,p 443–452. 2011.

PAULETE, J.; BEÇAK , W. Técnicas de Citologia e Histologia. 2 Vols. São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, 1976.

PAULO, D.V.; FONTES, F.M.; FLORES-LOPES, F. Histopathological alterations observed in the liver of *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) as a tool for the environmental quality assessment of the Cachoeira River, BA. Brazilian Journal of Biology. vol. 72, no. 1, p. 131-140, 2012.

SARAVANAN,M.; KUMAR,K.P.; RAMESH,M. Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. Pesticide Biochemistry and Physiology. Vol 100,p 206-211, 2011.

SCHLENK D. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. Mar Pollut Bull., v. 39, p. 48-53, 1999.

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., FERNANDES M.N., MARTINEZ C. B. R. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicology .vol 20, p 1400-1410, 2011.

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, p.112-120 ,2008.

SPERANZA, E. D.; COLOMBO, J. C. Biochemical composition of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* along pollution gradients in the Paraná-Rio de la Plata Basin. Journal of Fish Biology. Vol.74, p 1226–1244, 2009.

STEHR C.M., MYERS M. S., BURROWS D. G., KRAHN M.M., MEADOR J. P., McCAIN B.B. , VARANASI U. Chemical contamination and associated liver diseases in two species of fish from San Francisco Bay and Bodega Bay. Ecotoxicology. Vol. 6, p 35– 65,1997.

TAKASUSUKI, J., ARAUJO, M.R.R., FERNANDES, M.N.. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. Vol.72, p. 1075–1082, 2004.

TREMP H., KOHLER A. The usefulness of macrophyte-monitoring systems, exemplified on eutrophication and acidification of running waters. Acta Bot Gall . vol.142,p 541–550. 1995.

TRONCOSO, I. T.; CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; BISTONI, M. A. Histopathological changes in the gills and liver of *Prochilodus lineatus* from the Salado River basin (Santa Fe, Argentina). Fish Physiology Biochemistry, 2011.

VAN DER OOST, R.; BEYER,J.; VERMEULEN, N. P. E.. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology Pharmacology. vol. 13, p. 57-149, 2003.

WHYTE, J. J.; JUNG, R.E.; SCHMITT, C.J.; TILLITT, D.E.. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Critical Reviews in Toxicology. vol. 30, n. 4, p. 347–570, 2000.

WILLIAMS, G.M.; IATROPOULOS, M.J. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. Toxicologic Pathology., v. 30, n.1, p. 41-53, 2002.

WINKALER, E. U.; SANTOS, T. R.M.; MACHADO-NETO , J.G.; MARTINEZ, C. B.R. Acute lethal and sublethal effects of neem leaf extract on the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 145 ,p 236–244, 2007.

WOLF J.C.; WOLFE M.J. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. Toxicologic Pathology. Vol . 33, p75–85. 2005.