
Ciências Biológicas

Luciana Tendolini Brito

**Análise de brânquias de peixes expostos às
águas de ambiente lântico**

Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lêntico

Luciana Tendolini Brito

Orientadora: Carmem S. Fontanetti Christofolletti

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC apresentado ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção dos graus de Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas.

Rio Claro

Estado de São Paulo – Brasil

Outubro/2009

597 Brito, Luciana Tendolini
B862L Análise de brânquias de peixes expostos às águas de ambiente lântico
/ Luciana Tendolini Brito. - Rio Claro : [s.n.], 2009
41 f. : il., figs., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura e Bacharelado -
Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Carmem S. Fontanetti Christofolletti

1. Peixe. 2. Biomarcadores. 3. Metais. 4. Histologia. 5. Histoquímica.
6. Ultramorfologia. I. Título.

“O mar não me trouxe aqui, remei muito e muitos me ajudaram, contra
tempestades e ventos contrários”

(Eu)

Este trabalho é dedicado às pessoas que sempre acreditaram em mim, especialmente meus pais e meu irmão, de quem o amor não mediu esforços para que eu chegasse aqui.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo, especialmente pelo amor da minha família.

A minha mãe, meu pai e meu irmão, pelo apoio incondicional e por entenderem a minha ausência.

A Carmem, por sua paciência e por ter sido minha orientadora.

Ao professor Flávio, por tudo que me ensinou, seja em Biologia Celular, seja no PET, seja na vida.

A todos da SAEPE, mais que uma seção “que não tem nojo de aluno”, uma família: Neide, Aurélio, Odair, Roberto e Régia. E a querida Santina que conheci por lá.

Meus avós, por entenderem que meu trabalho exigia que eu ficasse isolada num quatinho lendo zilhões de artigos. Meus tios queridos, que me incentivaram e ajudaram em todo o tempo que estive na faculdade: Alice, Marcelo, Amália, Terezinha e Selma. A Dora e a Flávia, pelo carinho que sempre tiveram comigo e especialmente com meus pais e meu irmão nesses cinco anos.

Ao pessoal da portaria: Nei, Rogério, Dário e Mirtes pelo bom dia dado de coração, pelas brincadeiras de cobrar pedágio de tanto que passei pela portaria do CEAPLA.

A D. Tereza zeladora do Marielli por ter me ensinado a usar o tanquinho, ao S. Luis por ter sido um amigão quando eu morava naquele prédio, por me ensinar que a bicicleta deve ser travada pela roda de trás, por rir comigo no meu primeiro ano e me salvar das baratas. A Rosana zeladora do Pantoja, por ter me recebido na Vila Nova.

Agradeço por ter conhecido minha melhor amiga Leila, companheira, confiável, atenciosa, observadora da natureza humana, animal e vegetal. Pelas risadas e broncas que trocamos nas horas certas. Pelas vezes que me tirou da toca para ir pra balada. Por entender minha pressão baixa e o frio que sinto. Por me ensinar a não ser tão resmungona, que é preciso desencanar um

pouco. Pelas vezes que sentamos na calçada pra tomar sorvete. Pela segurança que sentia em sua companhia. Pelos cursos que fizemos juntas nas férias. Por ter conhecido sua família e termos dado força uns aos outros quando ela se juntou aos outros anjos.

As turmas de Biologia de 2004 a 2007, por terem me ajudado quando mais precisei. Agradeço a cada um que me ajudou a seu modo. Ao Sam (Vlamir Bozzatto) e ao Siri (Bruno Grisolia) pela luz, pelos ideais, ao Dias e ao Beto do PET por me ensinarem a caminhar no grupo com integridade, a Anally pelo exemplo. A Lígia por ter me ajudado nos momentos de baixa auto-estima e também por ter experimentado minhas experiências na cozinha.

Agradeço aos meus amigos e colegas de outros cursos, pelos sorvetes, lanches, conversas, almoços, batalhas de War e Banco Imobiliário, etc.

Agradeço à Cintya Christofolletti e a Danila Torres pelo apoio nas coletas de água.

Agradeço também, por toda a demora, falta e dano de material que me deixaram nervosa e atrasada nesse trabalho. Pode parecer sarcasmo, mas, afinal, aprendi muito com tudo isso: nem tudo depende da gente e imprevistos ocorrem. O importante é não debandar para o lado negro da força.

Espero não ter deixado nada nem ninguém de lado, mas como isso é impossível peço desculpa, pois agradeço por tudo que foi, é e será parte de mim.

Sumário

	Página
1. Introdução.....	07
2. Objetivos.....	13
3. Material e Métodos.....	13
3.1 Material.....	13
3.1.1 Material biológico.....	13
3.1.2 Localização da área de coleta das amostras de água.....	14
3.2 Métodos.....	14
3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	14
3.2.2 Histologia.....	15
3.2.3 Histoquímica.....	15
4. Resultados e discussão.....	15
Artigo.....	16
5. Referências.....	35

INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos lênticos podem ser de água doce ou salgada. Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2008), são caracterizados por águas paradas, de movimento lento ou estagnado, , como os lagos, lagoas, meandros perdidos e tanques. Em relação à topografia circundante, geralmente estão em níveis mais baixos, recebendo por isso matérias orgânicas e nutrientes dissolvidos das águas de drenagem. Nesses ecossistemas são encontrados bactérias, algas, plantas, peixes, anfíbios, insetos, entre outras formas de vida. Quanto à produção de matéria orgânica, podem ser classificados como oligotróficos (pouca produção), mesotróficos (média produção) e eutróficos (alta produção).

Os lagos são fenômenos de curta durabilidade na escala geológica, comumente tornam-se ambientes terrestres (ESTEVES, 1998). A produção de matéria orgânica pode ser intensificada pela ação antrópica, acelerando o processo de eutrofização. Quando ocorre enriquecimento de um corpo d'água por adição de nutrientes dissolvidos, especialmente nitrato e fosfato, via despejo de esgotos, por exemplo, em lagos, rios, estuários e regiões costeiras marinhas temos o processo de eutrofização cultural, na qual esses nutrientes promovem a proliferação de algas, desencadeando uma série de acontecimentos que culminam em pobreza de oxigênio (TOWNSEND et al., 2006).

O Lago Azul em Rio Claro-SP é um corpo d'água de superfície natural, que faz parte da bacia do Córrego da Servidão, para onde escoam as águas pluviais de diversos bairros da cidade (CERRI et al., 2003). É acompanhado de 110.000m² de área verde e do Centro Cultural Roberto Palmari, sendo uma área utilizada pela população para lazer, especialmente caminhadas, atividades artísticas e culturais (CANAL RIO CLARO, 2008).

Segundo imprensa local, os usuários anseiam por conservação como um todo, principalmente das águas e melhor infra-estrutura, como iluminação, banheiros limpos e segurança. Nessa mesma pesquisa, é indicado que 45% dos entrevistados sentem aversão pelo lago, o qual se encontra sujo e mal-cheiroso (JORNAL CIDADE, 2008).

De acordo com Francisco Marcucci, administrador do Lago Azul, os funcionários municipais retiram por dia quase um caminhão de lixo das águas do Lago Azul, constituído de garrafas pet, sacos de lixo, papel e muitas vezes até animais mortos (JORNAL CIDADE, 2009). Segundo laudo de coleta de água deste lago pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB (2006), realizada em agosto de 2006, havia despejo de esgotos clandestinos no lago.

A falta de saneamento é uma ameaça à qualidade das águas e à saúde pública, incluindo doenças como febre tifóide, salmonelose, disenteria basilar, disenteria amebiana, cólera, diarreia, hepatite tipo A e giardíase (VERSOLATO, 2009, p. H11). A qualidade da água tende a piorar graças ao elevado crescimento populacional e produção industrial, uma vez que ela pode ser contaminada por coliformes fecais e resíduos (efluentes), devido ao escoamento sanitário proveniente do despejo destes resíduos em rios ou lagos. (ÁVILA; MONTE-MÓR, 2007). No Brasil apenas 30% do esgoto coletado é tratado (VERSOLATO, 2009, p.H10).

A água, enquanto solvente universal é capaz de dissolver e transportar resíduos para longe do local de origem, degradando seriamente o ambiente que a captar quando poluída e ou contaminada (WHITE; RASMUSSEN, 1998).

As oscilações das condições físico-químicas podem ocorrer além do normal, caracterizando também um estado de poluição, como no caso de aumento exagerado da temperatura, diminuição nos níveis de oxigênio dissolvido ou na salinidade, entre outros (FANTA, 1991).

Além da água captada, outros aspectos devem ser considerados na composição de um lago. Metais pesados em corpos de superfície são encontrados em diferentes concentrações e dependentes de diversos fatores, entre eles o transporte pelo ar, pontos locais da nascente, presença natural em rochas do fundo do leito e no solo, e transporte aéreo de poeira do solo (SKJELKVALE et al., 2001).

A importância da água é cada vez mais notada, em paralelo à sua previsão de escassez em qualidade e quantidade, uma vez que os recursos hídricos são finitos e sua distribuição é irregular ao longo da crosta terrestre. Conflitos podem surgir em um futuro próximo, uma vez que não existem

substitutos para a água e estima-se que em 66 anos sua falta será crônica para 3 a 7 bilhões de pessoas (FRASÃO, 2009, p. H2, p. H4).

Nesse contexto, destacam-se as metodologias desenvolvidas para identificar, reconhecer, prevenir e minimizar efeitos ambientais adversos. Na década de 60 foram padronizados testes de toxicidade aguda, com 96h de duração, dentro de metodologias em Toxicologia Aquática (BERTOLETTI, 1990 apud MACHADO, 1999).

Adaptações morfofuncionais selecionadas ao longo da evolução permitiram aos peixes ocupar grande diversidade de ambientes (MACHADO, 1999), como as águas abertas, fundos arenosos, rochosos e lodosos, fendas dos recifes de corais, baías salgadas e estuários, rios e lagos de água ácida ou alcalina, águas de cavernas, em fontes quentes, ou em águas polares (ROMER; PARSONS, 1985 apud MACHADO, 1999).

Segundo Popma e Masser (1999), “tilápia” é o nome genérico de um grupo de ciclídeos endêmicos da África. A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) foi introduzida no Brasil em 1971, em Fortaleza, e em muitas represas e lagoas artificiais do Estado de São Paulo por pescadores, sendo atualmente, a espécie de ocorrência mais comum nesses ambientes (BEYRUTH et al., 2004). É uma espécie onívora, capaz de explorar os recursos dos ambientes lênticos que as poucas espécies nativas não são capazes por todo, alimentando-se de detritos, fragmentos de macrófitas, plâncton e silte (TADESSE, 1999).

A tilápia é um bom bioindicador por vários fatores: é de fácil identificação, ocorre em ampla distribuição geográfica mesmo com as mais adversas condições ambientais como extremos de temperatura e oxigênio, presença de poluentes de natureza variada, é de fácil manejo, causa poucos problemas de impacto ambiental, além de ser conhecida por responder rapidamente a alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996; POPMA; MASSER, 1999). São diversos os trabalhos realizados com este peixe, os quais utilizam análises histológicas (SCHWAIGER et al., 1997; BIAGINI et al., 2009; van den HEUVEL et al., 2000), análises bioquímicas (LUCARELLI, 2006), análises genotóxicas e mutagênicas (FERNANDES, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; CHRISTOFOLETTI, 2008) entre outras.

As brânquias de peixes passaram a ser utilizadas como modelo para estudos de impacto ambiental por serem uma das primeiras estruturas a ter contato com o meio externo (FANTA, 1991) e se adaptarem com rapidez às condições a elas impostas (MISHIRA et al., 1985; MACHADO, 1999). Elas são o principal sítio de trocas gasosas (HUGHES, 1966; 1982), envolvidas com osmorregulação (GONZALES; McDONALD, 1992), equilíbrio ácido-básico (McDONALD et al., 1991; WOOD, 1991), excreção de compostos nitrogenados (EVANS; CAMERON, 1986) sendo adequadas, portanto, em estudos de toxicologia aquática. Segundo Schwaiger et al. (1997), é possível diferenciar, por meio da análise histopatológica, as lesões causadas por doenças das causadas por exposição a poluentes.

Filamentos, ou lamelas primárias, compõem as brânquias, dispostos em arcos duplos ao longo do osso. Dos filamentos originam-se as lamelas secundárias, as quais estão dispostas perpendicularmente a eles desde suas bases, até as extremidades (SCHMIDT-NIELSEN, 2002; RANDALL et al., 2000). As células constituintes das lamelas são geralmente de três tipos: células pilares, controladoras do fluxo de outras células no interior da lamela e que atuam como colunas, pois evitam o abaulamento da mesma pela alta pressão sanguínea (RANDALL et al., 2000); células do epitélio respiratório, responsáveis pelas trocas; e hemácias, que circulam constantemente no interior das lamelas.

O epitélio respiratório é constituído por diferentes tipos celulares, como as pavimentosas ou respiratórias, células mucosas e células clorídricas.

As células pavimentosas constituem a maior parte da superfície branquial, sendo de aparência semelhante a impressões digitais devido às suas cristas dispostas circularmente. Estas cristas ampliam a superfície celular, conseqüentemente aumentando a transferência gasosa (EVANS et al., 1999). Espécimes de *Oreochromis mossambicus*, expostas a cádmio por Wong e Wong (2000), apresentaram redução no número de cristas. Ao expor *Prochilodus scrofa* a diferentes concentrações de cobre, Mazon et al. (2002) também observaram essa redução.

As células mucosas situam-se preferencialmente na porção basal dos filamentos e nas regiões interlamelares. São poucos os estudos relativos às

células mucosas das brânquias dos peixes (AHUJA, 1970; PERERA, 1993; DÍAZ et al., 2001; BIAGINI et al., 2009; NERO et al., 2006). O muco, produzido por estas células, apresenta funções de lubrificação, proteção do tecido contra microorganismos patogênicos (DÍAZ et al., 2001) e a resistência a doenças e substâncias tóxicas (BERNET et al., 1999). Essa secreção também atua na regulação e difusão de íons (SHEPHARD, 1982; HANDY et al., 1989; DÍAZ et al., 2001).

As células clorídricas, também ditas “células ricas em mitocôndrias” (van der HEIJDEN et al., 1997; PERRY, 1997; SARDET et al., 1979), são encontradas nos peixes e localizam-se preferencialmente na região basal das lamelas, mas também podem ser encontradas na região apical. Em condições normais ocupam uma pequena fração da superfície epitelial exposta ao ambiente. Suas funções são relacionadas à regulação iônica, balanço ácido-básico e redução de transferências gasosas (PERRY, 1997). Fatores ambientais podem influenciar seu número, tamanho, forma e estrutura (JAGOE; HAINES, 1990). São retraídas e raras em peixes de água doce, mas em enguias transferidas para água salgada são ativadas em até 4 dias, sendo a brânquia transformada em do tipo marinha em um mês (OGURI, 1982). Segundo Wong e Wong (1999), as células clorídricas possivelmente são o primeiro alvo atingido pela toxicidade do cádmio, pois nelas se encontram os sítios de acoplamento para Ca^{2+} -ATPase, a qual é inibida por baixíssimas concentrações de cádmio.

Segundo Laurent e Perry (1991), o nitrito compete com o cloro pelos sítios de troca $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e possivelmente, a proliferação de células clorídricas seria uma tentativa de ajuste para manter as concentrações internas de cloro adequadas, daí serem chamadas de “células clorídricas”. Também são chamadas de células ricas em mitocôndrias (van der HEIJDEN et al., 1997;), mas as células pavimentosas também o são, sendo o sistema tubular que surge das extensões das membranas basolaterais mais eficiente para diferenciá-las (PERRY et al., 1992). Sardet et al. (1979), trabalhando com adaptação de peixes à água tipo marinha 200% salgada, observaram poucas mitocôndrias nesse tipo celular.

Na tilápia *Oreochromis mossambicus*, Perry et al. (1992) observaram que a membrana apical das células clorídricas pode se apresentar como um nicho formado entre as células pavimentosas adjacentes, estrutura esta que é associada às células clorídricas de peixes marinhos.

Em *Oreochromis mossambicus* existem três tipos de pequenos buracos entre as células pavimentosas os quais terminam em células clorídricas: o tipo I, preenchido por extensões celulares, de aparência semelhante a favo de mel; o tipo II, com extensões maiores e globulares; e o tipo III, invaginado profundamente e de orifício menor que os outros tipos (van der HEIJDEN et al., 1997). No trabalho de van der Heijden et al. (1997), o tipo I foi o mais freqüente em água doce; o tipo III foi o único encontrado em animais adaptados à água marinha.

Os principais tipos de respostas branquiais frente a agentes físicos e químicos presentes no ambiente foram levantados estatisticamente por Mallat (1985). Tendo enfoque nas regiões lamelar e interlamelar, as principais alterações morfológicas encontradas, na ordem de freqüência, foram: descolamento do epitélio, necrose, fusão lamelar, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia ou fusão lamelar por crescimento celular, diminuindo a área de superfície respiratória, ruptura das células epiteliais, hipersecreção de muco, aneurisma lamelar, congestão vascular, proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto.

Bernet et al. (1999) propuseram um protocolo para análise das alterações encontradas em brânquias expostas à diferentes poluentes. Segundo o protocolo, as alterações histopatológicas podem ocorrer em cinco grupos: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia. Os distúrbios circulatórios compreendem hemorragias, aneurismas e edemas intercelulares. As alterações regressivas referem-se àquelas que reduzem e ou levam a perda do órgão, como atrofia e necrose. As alterações progressivas aumentam a atividade celular ou tecidual, como nos casos de hipertrofia, hiperplasia e aumento da produção de muco. A inflamação, por também ser associada a outros grupos, é entendida como um senso estrito para exudados ricos em proteínas, ativação do sistema retículo-endotelial e infiltração de leucócitos. Além de agrupar as alterações, esse

protocolo as classifica quanto sua relevância: mínima, quando facilmente reversível pelo fim da exposição; moderada, quando reversível se o estressor é neutralizado; e acentuada, quando irreversível, levando à perda parcial ou total do órgão.

Diante do contexto exposto, este trabalho visou avaliar a qualidade da água de um ambiente lântico nas brânquias de tilápias após exposição aguda.

2. Objetivos

Este trabalho teve por objetivo avaliar o impacto das águas de um ambiente lântico impactado (Lago Azul, Rio Claro/ SP) nas brânquias de peixes em exposição aguda e assim inferir a qualidade das águas do lago objeto de estudo. Alterações na superfície branquial foram analisadas ultramorfologicamente para verificar a proliferação de tipos celulares, bem como alterações estruturais; a morfologia do tecido branquial por histologia; e a histoquímica foi utilizada com a finalidade de evidenciar determinados tipos celulares e possíveis alterações fisiológicas.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Material Biológico

Foram utilizados peixes de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), a popular tilápia do Nilo, provenientes de piscicultura (UNESP – Campus de Rio Claro). Esses peixes foram aclimatados no Instituto de Biociências em aquários sob condições controladas, com sistema de filtração e aeração adequadas. Cinco peixes foram expostos à água de ambiente lântico (Lago Azul, Rio Claro-SP) e cinco permaneceram em aquário contendo água de poço artesiano, considerada limpa, constituindo o grupo controle em cada uma das coletas.

Ao total, foram realizadas quatro coletas, duas de verão (estação chuvosa) e duas de inverno (estação seca). A terceira coleta, realizada em agosto de

2007, necessitou de uma diluição e de mais cinco peixes para o grupo exposto diluído. Cada animal tinha, em média, 10 cm de comprimento.

3.1.2. Localização da área de coleta das amostras de água

A área utilizada para coleta das amostras de água (Figs.1A, 1B) foi o Lago Azul (Rio Claro-SP), cujas coordenadas geográficas são 22°23'43" de latitude sul e 47°33'51" de longitude oeste. Esse corpo d'água faz parte da bacia do Córrego da Servidão, para onde escoam as águas pluviais de vários bairros da cidade (CERRI et al., 2003).

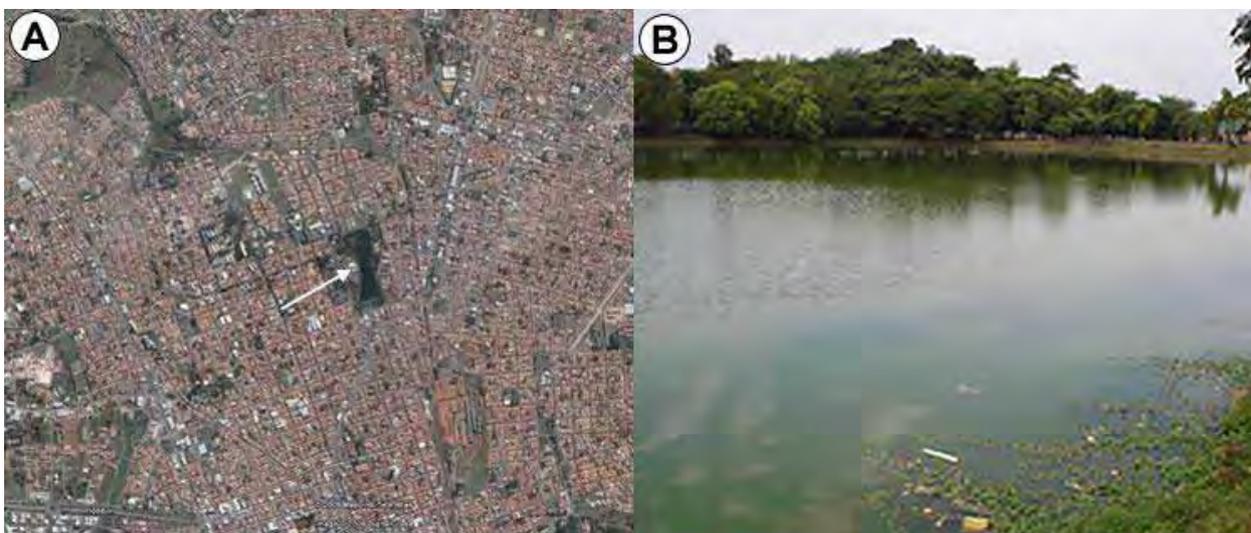


Fig. 1. Localização do Lago Azul: em A, a seta indica o Lago na cidade de Rio Claro. Em B, observa-se a sujeira na margem do lago.

Fonte: Google Earth, 2009

Foto: Luciana Tendolini Brito.

3.2. Métodos

3.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura

O segundo arco branquial dos animais foi retirado e fixado em solução Karnovsky gelada (KARNOVSKY, 1965). Este material foi então desidratado em uma série com concentrações crescentes de acetona e levado ao ponto crítico. O arco foi seccionado de modo a permitir a varredura de suas faces interna e externa. O material foi colado em suporte metálico e vaporizado com

ouro. O material foi então analisado e fotografado ao Microscópio Eletrônico de Varredura Philips, operado a 12kV.

3.2.2. Histologia

Os espécimes tiveram o segundo arco branquial extraído e fixado em Carnoy ou paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas em geladeira. Após a fixação, o material foi colocado em tampão fosfato de sódio pH 7,4 para depois ser desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90, 95% durante 30 minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de resina de embebição Historesina Leica durante 24 horas ou mais, mantidos em geladeira. O material foi então colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. A resina secou e endureceu em estufa, então foi colada em bloco de madeira e levada para microtomia. O material foi seccionado a espessura de 6 μm com auxílio do micrótomo Sorvall JB-4 BIO RAD; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) ou submetidas à técnica histoquímica.

3.2.3. Histoquímica – para detecção de polissacarídeos neutros (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As lâminas cujo material fora fixado em Carnoy, passaram por oxidação em solução de ácido periódico 0,4% por 10 minutos. Posteriormente, foram expostas ao reativo de Schiff por aproximadamente 1 hora no escuro. Decorrido este tempo, as lâminas foram mergulhadas em água sulfurosa por 3 minutos e lavadas em água corrente por 30 minutos. Após secas e montadas com bálsamo do Canadá, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz e fotografadas.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos serão apresentados na forma de um artigo, que será enviado para publicação em uma revista especializada.

ARTIGO**BRÂNQUIAS DE *Oreochromis niloticus* (TILÁPIA DO NILO) SUBMETIDAS AGUDAMENTE ÀS ÁGUAS DE AMBIENTE LÊNTICO IMPACTADO POR METAIS.**

Luciana Tendolini Brito, Carmem Silvia Fontanetti

ARTIGO

BRÂNQUIAS DE *Oreochromis niloticus* (TILÁPIA DO NILO) SUBMETIDAS AGUDAMENTE ÀS ÁGUAS DE AMBIENTE LÊNTICO IMPACTADO POR METAIS.

GILLS OF *Oreochromis niloticus* (NILE TILAPIA) ACUTLY SUBMITTED TO METALS IMPACTED LENTIC WATERS.

Luciana Tendolini Brito¹, Carmem Silvia Fontanetti²

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Rio Claro, SP, Brasil.

Av. 24-A, 1515 CEP: 13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

1:emiliacbi@yahoo.com.br; 2: fontanet@rc.unesp.br

RESUMO

Os ambientes lênticos comumente são alvos da poluição, recebendo desde matéria orgânica excessiva, material particulado e até metais. São raros os estudos que avaliam a qualidade desse tipo de ambiente, entretanto, os estudos feitos nessa área têm trazido muitas informações sobre o efeito destes em bioindicadores. Nesse trabalho, utilizamos *Oreochromis niloticus*, tilápia-do-Nilo, como bioindicador e suas brânquias como biomarcadores da qualidade da água de um lago urbano impactado (Lago Azul, Rio Claro-SP). As tilápias são abundantes, de fácil identificação e manejo, além serem boas bioindicadoras por apresentarem respostas rápidas quando expostas a poluentes. As brânquias são órgãos diretamente envolvidos em trocas com a água, sejam gasosas, iônicas ou de excreção, o que as leva a se adaptarem rapidamente às condições dessa água como medida de sobrevivência. O bioensaio consistiu em exposição aguda (96h), de tilápias oriundas de piscicultura, à água do lago. Um grupo controle foi mantido sob as mesmas condições em água oriunda de poço artesiano. Após a exposição, o segundo arco branquial foi extraído e fixado em diferentes soluções para análises histológica (paraformaldeído 4%), histoquímica (Carnoy) e ultramorfológica (solução Karnovsky). A ultramorfologia revelou grande perda de cristas nas células pavimentosas e proliferação de células do tipo clorídrica. A análise histológica das brânquias de todos os indivíduos do grupo exposto à água do lago apresentou,

principalmente, fusões lamelares; foram também observados casos isolados de aneurisma lamelar e desprendimento epitelial. A análise histoquímica demonstrou uma hipersecreção de muco, sem a proliferação de células mucosas. Todas essas alterações observadas contribuem para a compreensão dos efeitos da eutrofização e da poluição por metais pesados como Ag, Cd²⁺, Cu e Fe³⁺, Al³⁺ e Hg.

Palavras-chave: brânquias; poluição; ultramorfologia; células clorídricas; hipersecreção de muco.

INTRODUÇÃO

A A qualidade da água tende a piorar graças ao elevado crescimento populacional e produção industrial, uma vez que ela pode ser contaminada por coliformes fecais e efluentes, devido ao escoamento sanitário proveniente do despejo destes resíduos em rios ou lagos (ÁVILA; MONTE-MÓR, 2007). No Brasil apenas 30% do esgoto coletado é tratado (VERSOLATO, 2009, p. H10).

Os lagos são fenômenos de curta durabilidade na escala geológica, comumente tornam-se ambientes terrestres (ESTEVES, 1998). A produção de matéria orgânica pode ser intensificada pela ação antrópica, acelerando o processo de eutrofização. Poucos são os trabalhos sobre a qualidade da água de ambientes lênticos (RASHED, 2001; GRISOLIA; STARLING, 2001; BUTTOW et al., 2004), quando comparados com os de outros ambientes como rios e mares; as características ecotoxicológicas de lagos são de difícil caracterização e interpretação.

A tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) é um bom bioindicador por vários fatores: é de fácil identificação, ocorre em ampla distribuição geográfica, suporta certos limites de temperatura e oxigênio, suporta a presença de poluentes de natureza variada, é de fácil manejo, causa poucos problemas de impacto ambiental, além de ser conhecida por responder rapidamente a alterações ambientais (VIJAYAN et al., 1996; POPMA; MASSER, 1999).

São diversos os trabalhos realizados com este peixe, os quais utilizam análises histológicas (SCHWAIGER et al., 1997; BIAGINI et al., 2009; VAN DEN HEUVEL et al., 2000), análises bioquímicas (LUCARELLI, 2006), análises

genotóxicas e mutagênicas (FERNANDES, 2005; SOUZA; FONTANETTI, 2006; CHRISTOFOLETTI, 2008) entre outras.

As brânquias de peixes passaram a ser utilizadas como modelo para estudos de impacto ambiental por serem uma das primeiras estruturas a ter contato com o meio externo (FANTA, 1991) e se adaptarem com rapidez às condições a elas impostas (MISHIRA et al., 1985; MACHADO 1999). Elas são o principal sítio de trocas gasosas (HUGHES, 1966, 1982), envolvidas com osmorregulação (GONZALES; McDONALD, 1992), equilíbrio ácido-básico (McDONALD et al., 1991; WOOD, 1991), excreção de compostos nitrogenados (EVANS; CAMERON, 1986) sendo adequadas, portanto, em estudos de toxicologia aquática. Segundo Schwaiger et al., (1997), é possível diferenciar, por meio da análise histopatológica, as lesões causadas por doenças das causadas por exposição a poluentes.

Dos filamentos branquiais, dispostos em arcos duplos ao longo do osso originam-se as lamelas secundárias, perpendicularmente a eles desde suas bases, até as extremidades (SCHMIDT-NIELSEN, 2002; RANDALL et al., 2000). As células constituintes das lamelas são geralmente de três tipos: células pilares, controladoras do fluxo de outras células no interior da lamela e que atuam como colunas, pois evitam o abaulamento da mesma pela alta pressão sanguínea (RANDALL et al., 2000); células do epitélio respiratório, responsáveis pelas trocas; e hemácias, que circulam constantemente no interior das lamelas. O epitélio respiratório é constituído por diferentes tipos celulares, como as pavimentosas ou respiratórias, células mucosas e células clorídricas (MACHADO, 1999).

Bernet et al. (1999) propuseram um protocolo para análise das alterações encontradas em brânquias expostas a diferentes poluentes. Segundo o protocolo, as alterações histopatológicas podem ocorrer em cinco grupos: distúrbios circulatórios, alterações regressivas, alterações progressivas, inflamação e neoplasia.

Diante do exposto, foi objetivo deste trabalho avaliar o impacto das águas de um ambiente lântico impactado, um lago urbano, nas brânquias de *Oreochromis niloticus* em exposição aguda por meio de análise ultramorfologica, histológica e histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados peixes de *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae), a popular tilápia do Nilo, provenientes de piscicultura (UNESP – Campus de Rio Claro). Esses peixes foram aclimatados no Instituto de Biociências em aquários sob condições controladas, com sistema de filtração e aeração adequadas. Cinco peixes foram expostos à água de ambiente lântico (Lago Azul, Rio Claro-SP, 22°23'43" S, 47°33'51" O) e cinco permaneceram em aquário contendo água limpa de poço artesiano, constituindo o grupo controle. Foram realizadas quatro coletas, duas no verão (temporada úmida), em março de 2007 e fevereiro de 2008, e duas no inverno (temporada seca), agosto de 2006 e agosto de 2007. A coleta realizada em agosto de 2007 necessitou de uma diluição da água do lago e de mais cinco peixes para o grupo exposto diluído.

Cada animal tinha, em média, 10 cm de comprimento.

Foram realizadas análises físico-químicas das águas do lago nas coletas de agosto de 2007 e fevereiro de 2008.

Os dados meteorológicos foram obtidos junto ao Centro de Análise e Planejamento Ambiental (CEAPLA) da Unesp Rio Claro.

Microscopia Eletrônica de Varredura

O segundo arco branquial dos animais foi retirado e fixado em Karnovsky gelado (KARNOVSKY, 1965). Este material foi então desidratado em uma série com concentrações crescentes de acetona e levado ao ponto crítico. O arco foi seccionado de modo a permitir a varredura de suas faces interna e externa. O material foi colado em suporte metálico e vaporizado com ouro. O material foi então analisado e fotografado ao Microscópio Eletrônico de Varredura Philips, operado a 12kV.

Histologia e Histoquímica

Os espécimes tiveram o segundo arco branquial extraído e fixado em Carnoy ou paraformaldeído 4% por aproximadamente 24 horas em geladeira. Após a fixação, o material foi colocado em tampão fosfato de sódio pH 7,4 para depois ser desidratado em soluções de etanol 70, 80, 90, 95% durante 30

minutos cada banho. Posteriormente, o material foi transferido para uma solução de resina de embebição Historesina Leica durante 24 horas ou mais, mantidos em geladeira. O material foi então colocado em moldes preenchidos com resina contendo catalisador. O material foi seccionado a espessura de 6 μm com auxílio do micrótomo Sorvall JB-4 BIO RAD; as secções foram hidratadas e recolhidas em lâminas. Depois de secas, as lâminas foram coradas com Hematoxilina/Eosina (para análise da morfologia), PAS (para detecção de polissacarídeos), Azul de Bromofenol (para detecção de proteínas) segundo Junqueira e Junqueira (1983). Após secas e montadas com bálsamo do Canadá, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz e fotografadas.

RESULTADOS

Análises físico-químicas da água do lago

Foram detectadas elevadas concentrações de Ag, Cd^{2+} , Cu, Fe^{3+} nas duas coletas analisadas. Na amostra da estação seca, foi detectado ainda altos índices de Al^{3+} e Hg (Tabela 1). Os valores observados estão acima dos limites estabelecidos pela portaria 357/2005, do CONAMA.

Os parâmetros de DBO, DQO, sólidos totais dissolvidos, condutividade elétrica, carbono orgânico total, turbidez, nitrito e nitrato também variaram para as duas estações.

Os dados meteorológicos obtidos pelo CEAPLA caracterizam bem as estações chuvosa e seca na cidade de Rio Claro/SP (Tabela 2).

Ultramorfologia

As células pavimentosas constituem a maior parte da superfície branquial, sendo de aparência semelhante a impressões digitais devido às suas cristas dispostas circularmente (Fig. 2A).

A análise ultramorfológica, realizada para as duas últimas coletas (agosto de 2007 e março de 2008), revelou grande perda de cristas nas células pavimentosas do grupo exposto (* nas Figs 2B, C).

A análise demonstrou ainda um aumento de 1,775 vezes de células clorídricas nos indivíduos expostos na água diluída oriunda da coleta de agosto de 2007 (Fig. 2B) e de 4,5 vezes na mesma água sem diluição (Fig. 2C).

Histologia

O grupo controle apresentou integridade morfológica nas brânquias de todos os indivíduos (Fig. 3A). No grupo exposto as águas do lago foram encontradas em todos os indivíduos fusões lamelares (Fig. 3B), em todas as coletas.

Nas coletas da estação chuvosa e na coleta da estação seca de agosto de 2007 observou-se em todos os indivíduos, proliferação de células clorídricas (Figs. 3B e 3C).

Na coleta de agosto de 2007, um indivíduo apresentou desprendimento epitelial (Fig. 3E) e apenas um da coleta de março de 2007 apresentou aneurisma lamelar (Fig. 3F).

Histoquímica

Foi observado nos indivíduos da coleta de agosto de 2007, expostos a água do lago diluída, uma hipersecreção de muco, detectada pela técnica de PAS (comparar Figs. 4A e 4B), sem proliferação de células mucosas. Nas demais coletas, a quantificação foi muito semelhante ao grupo controle, não sendo significativa.

DISCUSSÃO

Os principais tipos de respostas branquiais frente a agentes físicos e químicos presentes no ambiente foram levantados estatisticamente por Mallat (1985). Tendo enfoque nas regiões lamelar e interlamelar, as principais alterações morfológicas encontradas, na ordem de frequência, foram: descolamento do epitélio, necrose, fusão lamelar, hipertrofia das células epiteliais, hiperplasia ou fusão lamelar por crescimento celular, diminuindo a área de superfície respiratória, ruptura das células epiteliais, hipersecreção de

muco, aneurisma lamelar, congestão vascular, proliferação de células secretoras de muco e de células de cloreto.

Ainda, segundo Bernet et al. (1999), os distúrbios circulatórios compreendem hemorragias, aneurismas e edemas intercelulares. As alterações regressivas referem-se àquelas que reduzem e ou levam a perda do órgão, como atrofia e necrose. As alterações progressivas aumentam a atividade celular ou tecidual, como nos casos de hipertrofia, hiperplasia e aumento da produção de muco. A inflamação, por também ser associada a outros grupos, é entendida como um senso estrito para exudados ricos em proteínas, ativação do sistema retículo-endotelial e infiltração de leucócitos.

A principal alteração observada no presente estudo foi fusão lamelar, diminuição de cristas nas células pavimentosas e a proliferação de células clorídricas. Alterações estruturais, como fusão lamelar são consideradas alterações regressivas, pois reduzem e ou levam a perda do órgão, comprometendo sua função (BERNET et al., 1999). Também é regressiva a redução do número de cristas das células pavimentosas, as quais têm sua superfície de contato com o meio ambiente, reduzida. O desprendimento epitelial observado em um dois indivíduos também se enquadra nesta categoria. Resultado semelhante foi observado nas cristas das células pavimentosas expostas ao cádmio e cobre por Wong e Wong (2000) e a Mazon et al. (2002). As águas aqui em estudo também apresentam altos índices desses elementos.

As fusões lamelares foram encontradas em 50% dos estudos de exposição aguda a irritantes levantados por Mallat (1985).

As células clorídricas, também ditas “células ricas em mitocôndrias” (van der HEIJDEN et al., 1997; PERRY, 1997; SARDET et al., 1979), são encontradas em peixes de água doce e localizam-se preferencialmente na região basal das lamelas, mas também podem ser encontradas na região apical. Em condições normais ocupam uma pequena fração da superfície epitelial exposta ao ambiente. Suas funções são relacionadas à regulação iônica, balanço ácido-básico e redução de transferências gasosas (PERRY, 1997).

Fatores ambientais podem influenciar seu número, tamanho, forma e estrutura (JAGOE; HAINES, 1990). Segundo Wong e Wong (1999), as células clorídricas possivelmente são o primeiro alvo atingido pela toxicidade do cádmio, pois nelas se encontram os sítios de acoplamento para Ca^{2+} -ATPase, a qual é inibida por baixíssimas concentrações de cádmio. Os altos índices de cádmio observado na água aqui em questão devem ter provocado a proliferação das células clorídricas nas brânquias de *O. niloticus*.

Mallat (1985) evidenciou a hipersecreção de muco como observado aqui na coleta de agosto de 2007, em resposta à presença de metais, como encontrado no lago objeto do presente estudo.

A hipersecreção de muco, tida como alteração progressiva por aumentar a atividade celular (BERNET et al., 1999), foi encontrada em 55% dos estudos de exposição aguda a irritantes levantados por Mallat (1985).

As células mucosas situam-se preferencialmente na porção basal dos filamentos e nas regiões interlamelares. São poucos os estudos relativos às células mucosas das brânquias dos peixes (AHUJA, 1970; PERERA, 1993; DÍAZ, 2001; BIAGINI et al., 2009; NERO et al., 2006). O muco, produzido por estas células, apresenta funções de lubrificação, proteção do tecido contra microorganismos patogênicos (DÍAZ et al., 2000) e a resistência a doenças e substâncias tóxicas (BERNET et al., 1999). Essa secreção também atua na regulação e difusão de íons (SHEPHARD, 1982; HANDY et al., 1989; DÍAZ et al., 2001).

Lesões como os aneurismas são pouco comuns, ocorrendo em 6% das exposições agudas e em 15% das exposições crônicas letais e 16% das subletais (MALLAT, 1985).

Ao comparar estudos de diferentes classes de irritantes, Mallat (1985) observou que lesões como desprendimento epitelial e fusão estavam presentes em uma porcentagem semelhante nas classes de metais pesados e irritantes orgânicos, enquanto a secreção de muco foi bem mais expressiva na classe de metais pesados (53%) que na de irritantes orgânicos (22%).

A sazonalidade influenciou na concentração de elementos detectados na água do lago aqui em estudo; uma maior concentração de alguns dos metais observados em valores acima do permitido foi detectado na estação seca;

neste período, além de uma maior concentração destes elementos ocorre uma diminuição da coluna d'água nos reservatórios, aumentando a troca desta com o sedimento do lago.

É possível que exista um efeito sinérgico resultante da combinação da poluição por matéria orgânica e da poluição por metais tóxicos.

CONCLUSÃO

O comprometimento da qualidade da água do lago é evidenciado pelas alterações observadas: perda de cristas na superfície das células pavimentosas, proliferação de células clorídricas e fusão lamelar. As alterações significam, para os peixes, mecanismos de defesa e redução da eficiência respiratória contra as elevadas concentrações de metais (Ag, Al³⁺, Cd²⁺, Cu, Fe³⁺ e Hg) encontrados nas águas lânticas estudadas.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Gerson Mello, Monika Lamonte e Antônio Yabuki pelo apoio técnico, FUNDUNESP e PET pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

AHUJA, S.K. Chloride-cell and Mucus Cell Response to Chloride and Sulphate-enriched Media in the Gills of *Gambusia affinis affinis* (Baird and Girard) and *Catla catla* (Hamilton). **Journal of Fish Biology**, London, v.173, p. 231-250, 1970.

ÁVILA, J. L. T.; MONTE-MÓR, R. L. M. Urbanização e Impactos Ambientais: uma análise da relação entre as características dos espaços urbanos e a poluição hídrica na região do médio Rio Doce (MG). In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ECOLÓGICA, 7., 2007, Fortaleza. **Anais...**, Fortaleza, 2007, p.12

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 22, p. 25-34, 1999.

BIAGINI, F. R., DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, New York, v. 40, p. 839-844, 2009.

BUTTOW, M.; STEIN, V.; HEIDEN, G.; ALT, C. C.; BOBROWSKI, V. L. Biomonitoramento das águas do lago do Ônibus/UFPel. Disponível em: www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CB_0128.rtf. Acesso em: 05 fev. 2008.

CHRISTOFOLETTI, C. A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 118f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2008.

DÍAZ, A. O.; GARCÍA, A. M.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Mucous Cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and Ultrastructure. Anatomia, Histologia, Embryologia. **Journal of Veterinary Medicine Series**, Berlim, v.30, n.3, p. 135-139, 2001.

ESTEVEES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. p.63.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P.M.; POTTS, W. T. W. Ionic Transport in the Fish Gill Epithelium. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 283, p. 641–652, 1999.

EVANS, D. H.; CAMERON, J. N. Gill ammonia transport. **Journal of Experimental Zoology**, v. 239, p. 561-570, 1986.

FANTA, E. Ação de poluentes sobre os tecidos In: SANTOS, H. S. L. **Histologia de Peixes**. Jaboticabal: Funep, 1991. p. 32-37.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistema-teste**. 2005. 212f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

GONZALES, R. J.; McDONALD, D. G. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 163, p. 317-332, 1992.

GRISOLIA, C. K.; STARLING, F. L. R. M. Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 491, p. 39-44, 2001.

HANDY, R. D.; EDDY, F. B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **Journal of Fish Biology**, London, v. 35, p. 737-747, 1989.

HUGHES, G. M. An introduction to the study of the gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p. 1-24.

HUGHES, G. M. Species variation in gas exchange. **Proceedings of the Royal Medicine**, London, v.59, n. 6, p. 494-500, 1966.

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

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

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

LUCARELLI, A.C.T. **Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Teleostei; Cichlidae), expostas ao sulfato de cobre aquático**. 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Fisiológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Científica: Ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999.

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

McDONALD, D. G.; FREDA, J.; CAVDEK, V.; GONZALEZ, R.; ZIA, S. Interspecific differences in Gill morphology of freshwater fish in relation to tolerance of low-pH environments. **Physiological Zoology**, Chicago, v. 64, n.1, p.124-144, 1991.

MISHIRA, V.; LAL, H.; CHAWLA, G.; VISWANATAN, P. N. Pathomorphological changes in the gills of fish fingerlings (*Cirrhina mungala*) by lineal alkylbenzene

sulfonate. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v.10, p.302-308, 1985.

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

PERERA, K. M. L. Ultrastructure of the primary gill lamellae of *Scomber australasicus*. **Journal of Fish Biology**, London, v.43, p. 45-59, 1993.

PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.59, p. 325-347, 1997.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: Life History and Biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 283, Mar. 1999. (Publication n.283)

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 512-516.

RASHED, M. N.; Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. **Environment International**, New York, v.27, p. 27-33, 2001.

SARDET, C.; PISAM, M.; MAETZ, J. The surface epithelium of teleostean fish gills: Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. **The Journal Of Cell Biology**, New York, v 80, p. 96-117, 1979.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal**: adaptação e meio ambiente. 5. ed. São Paulo: Santos, 2002. p. 20-21.

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

SHEPHARD, K. L. The influence of mucus on the diffusion of chloride ions across the esophagus of fish. **Physiological Zoology**, Chicago, v.55, p. 23-24, 1982.

SKJELKVALE, B. L.; ANDERSEN, T.; FJELD, T. E.; MANNIO, J.; WILANDER, A.; JOHANSSON, K.; JENSEN, J. P.; MOISEENKO, T. Heavy Metal Surveys in

Nordic Lakes: Concentrations, Geographic Patterns and Relation to Critical Limits. **Ambio**, Stockholm, v.30, n. 1, 2001.

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

van den HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MacKINNON, M.; DIXON, D. G. Disease and Gill Lesions in Yellow Perch (*Perca flavescens*) Exposed to Oil Sands Mining-Associated Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. New York, v. 46, p. 334-341, 2000.

van der HEIJDEN, A. J. H.; VERBOST, P. M.; EYGENSTEYN, J.; LI, J.; WENDERLAAR BONGA, S. E.; FLICK, G. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to fresh water or sea water: quantification by confocal laser scanning microscopy. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.200, p.55-64, 1997.

VERSOLATO, B. A. Alerta no único rio limpo de SP. **O Estado de São Paulo**: São Paulo, 22 de março de 2009. V.H, p.10. (Caderno Especial: Sustentabilidade)

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

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

WOOD, C. M. Branchial Ion and acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. **Physiological Zoology**, Woodlawn, v. 64, n. 1 p. 68-102, 1991.

Tabela 1. Dados meteorológicos da cidade de Rio Claro–SP referentes aos períodos de coleta das amostras de água de um ambiente lântico, obtidos junto ao CEAPLA – IGCE – UNESP/ Rio Claro.

Período de coleta	Temperatura máxima (°C)	Temperatura mínima (°C)	Umidade Relativa do Ar (%)	Precipitação Total (mm)	Nº total de dias chuvosos
Agosto/2006	29,50	11,32	55,29	14,5	2
Março/2007	31,31	18,81	67,60	123,9	10
Agosto/2007	28,04	11,21	58,32	0	0
Fevereiro/2008	29,71	18,93	73,59	141,1	15

Nota: Os valores acima foram obtidos a partir das médias das medidas diárias.

Tabela 2. Comparação dos valores obtidos para as análises físico-químicas das águas superficiais do Lago Azul, para as coletas de agosto/2007 e fevereiro/2008.

Parâmetros Analíticos	CONAMA	Agosto/2007	Fevereiro/2008	Método	Limite de detecção
Ag (mg/L)	0,01	<0,09*	<0,09*	USEPA-SW 846	0,090
Al (mg/L)	0,1	0,695*	<0,050	USEPA-SW 846	0,050
As (mg/L)	0,01	<0,01	<0,01	USEPA-SW 846	0,010
Cd (mg/L)	0,001	<0,004*	<0,004*	USEPA-SW 846	0,004
Co (mg/L)	0,05	<0,002	<0,002	USEPA-SW 846	0,002
Cu (mg/L)	0,009	<0,025*	<0,025*	USEPA-SW 846	0,025
Cr total (mg/L)	0,05	<0,005	<0,005	USEPA-SW 846	0,005
Fe total (mg/L)	0,3	1,51*	0,379*	USEPA-SW 846	0,030
Hg (mg/L)	0,0002	<0,0006*	<0,0002	USEPA-SW 846	0,0006
Na (mg/L)	NA	9,8	3,8	SMEWW 3500-NA.B	0,1
Ni (mg/L)	0,025	<0,006	<0,006	USEPA-SW 846	0,006
Pb (mg/L)	0,01	<0,002	<0,002	USEPA-SW 846	0,002
Zn (mg/L)	0,18	<0,035	<0,004	USEPA-SW 846	0,004
Cloretos (mg/L)	250	6,67	6,67	USEPA 300.1.321	0,05
DBO (mg/L)	5	13*	4	SMEWW 5210.B	2
DQO (mg/L)	5	45*	<5	SMEWW 5220.D	1,67
pH	6,0 a 9,0	6,8	7,0	SMEWW 4500-H+.B	0,1
Sólidos totais dissolvidos (mg/L)	500	120	64	SMEWW 2540	1
Condutividade elétrica (µS/cm)	NA	500	80,9	SMEWW 2510.B	0,1
COT (mg/L)	NA	14,0	3,3	SMWW 5310.D Oxidação com persulfato - espectrofotômetro	NA
Nitrito (mg/L)	1	<0,15	0,055	USEPA 300.1-321	0,005
Nitrato (mg/L)	10	<0,015	1,12	USEPA 300.1-321	0,05
Turbidez (UNT)	100	63,0	8	SMEWW 2130.B	1

* Valores acima do permitido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) – portaria 357/2005.

Nota: NA – não aplicável

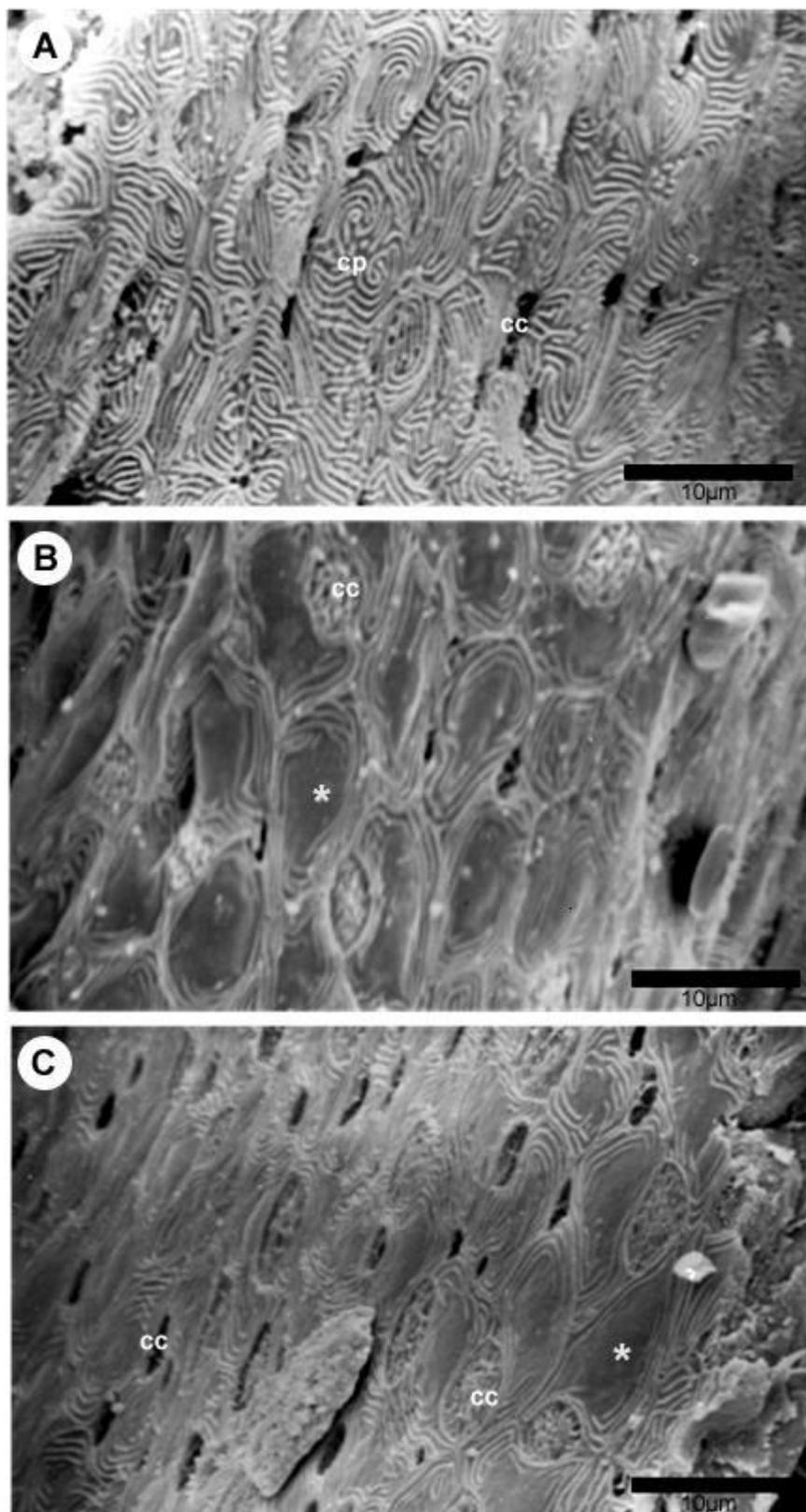


Fig.2. Ultrafotografia das brânquias de *O. niloticus*. A= grupo controle; B (com diluição), C (sem diluir)= grupo exposto. Em A observa-se que as células pavimentosas apresentam cristas preservadas e baixo número de células clorídricas; em B e C observa-se a perda de cristas e a proliferação de células clorídricas, maior em C. cc= célula clorídrica; cp= célula pavimentosa; *= célula com perda de cristas.

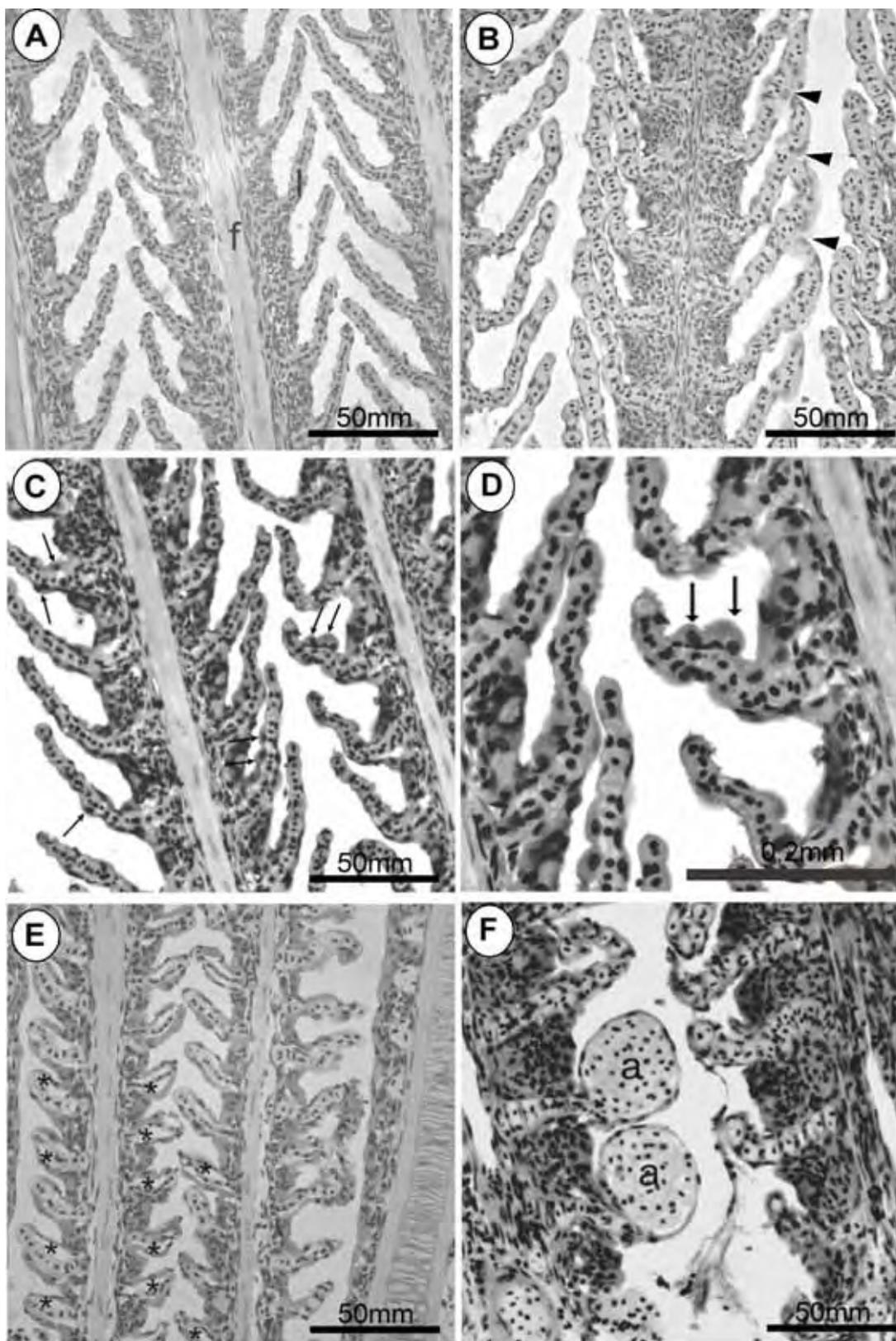


Fig.3- Brânquias de *O. niloticus* coradas por HE- A. grupo controle, B-E. grupo exposto. f= filamento; l= lamela; ponta de seta= fusão lamelar; setas= células clorídricas; *= desprendimento epitelial; a= aneurisma lamelar.

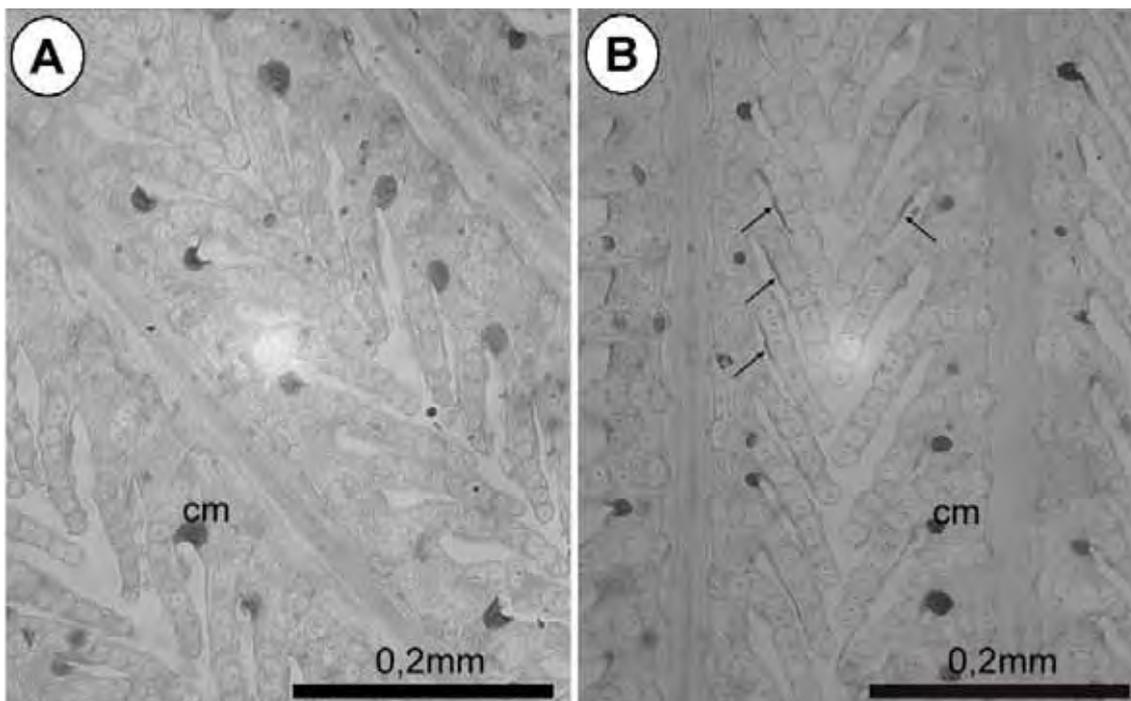


Fig. 4. Brânquias de *O. niloticus* submetidas à técnica de PAS, evidenciando células mucosas. (A) Grupo controle; (B) grupo exposto. cm= célula mucosa; as setas indicam hipersecreção de muco.

REFERÊNCIAS

AHUJA, S.K.. Chloride-cell and Mucus Cell Response to Chloride and Sulphate-enriched Media in the Gills of *Gambusia affinis affinis* (Baird and Girard) and *Catla catla* (Hamilton). **Journal of Fish Biology**, London, v.173, p. 231-250, 1970.

ÁVILA, J. L. T.; MONTE-MÓR, R. L. M. Urbanização e Impactos Ambientais: uma análise da relação entre as características dos espaços urbanos e a poluição hídrica na região do médio Rio Doce (MG). In: ENCONTRO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA ECOLÓGICA, 7., 2007, Fortaleza. Anais..., Fortaleza, 2007, p.12

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v. 22, p. 25-34, 1999.

BEYRUTH, Z.; MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FUSCO, S. M.; FARIA, F. C.; SILVA, A. L. Utilização de alimentos naturais por *Oreochromis niloticus* em tanques de terra com arraçoamento. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 9-24, 2004.

BIAGINI, F. R., DAVID, J. A. O.; FONTANETTI, C. S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. **Micron**, New York, v. 40, p. 839-844, 2009.

CANAL RIO CLARO. **Conheça os Pontos Turísticos de Rio Claro**, Disponível em: < <http://www.agitorioclaro.com.br>> Acesso em: 28 ago. 2009.

CERRI, L. E. S.; ZAINE, J. E.; NÓBREGA, C. A.; GIBOTTI JUNIOR, M. Estudo geológico-geotécnico em área de instalação de posto de combustível em Rio Claro (SP). **Geociências**, São Paulo, UNESP, v. 22, n. esp., p. 105-116, 2003.

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo. **Laudo técnico, of – 098/2006/CEI**. Piracicaba. SP, AGO 2006.

CHRISTOFOLETTI, C. A. **Avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico das águas de um ambiente lântico, por meio dos sistemas-teste de *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus***. 2008. 118f. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2008.

CONAMA – CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-. Disponível em: www.hidrolabor.com.br/Conama357.pdf+ambiente+l%C3%AAntico+l%C3%A9&hl=pt-BR&ct=clnk&cd=4&gl=br. Acesso em: 26 jan. 2008.

DÍAZ, A. O.; GARCÍA, A. M.; DEVINCENTI, C. V.; GOLDEMBERG, A. L. Mucous Cells in *Micropogonias furnieri* gills: Histochemistry and Ultrastructure. Anatomia, Histologia, Embryologia. **Journal of Veterinary Medicine Series**, Berlim, v.30, n.3, p. 135-139, 2001.

ESTEVES, F. A. **Fundamentos de limnologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. p.63.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P.M.; POTTS, W. T. W. Ionic Transport in the Fish Gill Epithelium. **Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 283, p. 641–652, 1999.

FANTA, E. Ação de poluentes sobre os tecidos In: SANTOS, H. S. L. **Histologia de Peixes**. Jaboticabal: Funep, 1991. p. 32-37.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistema-teste**. 2005. 212f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.

FRASÃO, L. Brasil debate com vizinhos uso racional da água. **O Estado de São Paulo**: São Paulo, 22 de março de 2009. V.H, p.2. (Caderno Especial: Sustentabilidade)

FRASÃO, L. Sem gestão haverá conflitos em breve. **O Estado de São Paulo**: São Paulo, 22 de março de 2009. V.H, p.4. (Caderno Especial: Sustentabilidade)

GONZALES, R. J.; McDONALD, D. G. The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 163, p. 317-332, 1992.

HANDY, R. D.; EDDY, F. B.; ROMAIN, G. In vitro evidence for the ionoregulatory role of rainbow trout mucus in acid, acid/aluminum and zinc toxicity. **Journal of Fish Biology**, London, v. 35, p. 737-747, 1989.

HUGHES, G. M. Species variation in gas exchange. **Proceedings of the Royal Medicine**, London, v.59, n. 6, p. 494-500, 1966.

HUGHES, G. M. An introduction to the study of the gills. In: HOULIHAN, D. F.; RANKIN, J. C.; SHUTTLEWORTH, T. J. **Gills**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p. 1-24.

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

JORNAL CIDADE. **Pesquisa aponta aversão ao lago azul**. Disponível em: <www.jornalcidade.net> Acesso em: 21 fev. 2008.

JORNAL CIDADE. **Lago Azul acumula um caminhão de lixo por dia**. Disponível em: <<http://jornalcidade.uol.com.br/paginas.php?id=40195>> Acesso em: 27 mar. 2009.

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

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

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

LUCARELLI, A.C.T. **Biomarcadores de estresse oxidativo em tilápia do Nilo, Oreochromis niloticus (Teleostei; Cichlidae), expostas ao sulfato de cobre aquático**. 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências Fisiológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas. **UNOPAR Científica: Ciências biológicas e da saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 63-76, out. 1999.

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

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M.N. Gill Cellular Changes Induced by Copper Exposure in the South American Tropical Freshwater Fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section A**, n. 88, p. 52-63, 2002.

McDONALD, D.G.; V. CAVDEK; R. ELLIS. 1991. Gill design in freshwater fishes: interrelationships among gas exchange, ion regulation, and acid-base regulation. *Physiol. Zool.* 64: 103-123.

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

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

OGURI, M. Gills. In: HIBIYA, T. **An Atlas of Fish Histology: normal and pathological features**. Tokyo: Kodansha, 1982. p.54-56.

PEARSE, A. T. E. **Histochemistry: theoretical and applied**. London: J. & A. Churchill, 1985, p. 998.

PERERA, K. M. L. Ultrastructure of the primary gill lamellae of *Scomber australasicus*. **Journal of Fish Biology**, London, v.43, p. 45-59, 1993.

PERRY, S. F.; GOSS, G. G.; LAURENT, P. The interrelationships between gill chloride cell morphology and ionic uptake in four freshwater teleosts. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v. 70, p. 1775-1786, 1992.

PERRY, S. F. The Chloride Cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v.59, p. 325-347, 1997.

POPMA, T.; MASSER, M. Tilapia: Life History and Biology. **Southern Regional Aquaculture Center**, n. 283, Mar. 1999. (Publication n.283)

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. Fisiologia Animal: mecanismos e adaptações. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 512-516.

SARDET, C.; PISAM, M.; MAETZ, J. The surface epithelium of teleostean fish gills: Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. **The Journal Of Cell Biology**, New York, v 80, p. 96-117, 1979.

SHEPHARD, K. L. The influence of mucus on the diffusion of chloride ions across the esophagus of fish. **Physiological Zoology**, Chicago, v.55, p. 23-24, 1982.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal**: adaptação e meio ambiente. 5. ed. São Paulo: Santos, 2002. p. 20-21.

SKJELKVALE, B. L.; ANDERSEN, T.; FJELD, T. E.; MANNIO, J.; WILANDER, A.; JOHANSSON, K.; JENSEN, J. P.; MOISEENKO, T. Heavy Metal Surveys in Nordic Lakes: Concentrations, Geographic Patterns and Relation to Critical Limits. **Ambio**, Stockolm, v.30, n. 1, 2001.

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

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

TADESSE, Z. The nutritional status and digestibility of *Oreochromis niloticus* L. diet in Lake Langeno, Ethiopia. **Hydrobiologia**, Hague, n.416, p.97-106, 1999.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em Ecologia**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. p. 485.

van den HEUVEL, M. R.; POWER, M.; RICHARDS, J.; MacKINNON, M.; DIXON, D. G. Disease and Gill Lesions in Yellow Perch (*Perca flavescens*) Exposed to Oil Sands Mining-Associated Waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. New York, v. 46, p. 334-341, 2000.

van der HEIJDEN, A. J. H.; VERBOST, P. M.; EYGENSTEYN, J.; LI, J.; WENDERLAAR BONGA, S. E.; FLICK, G. Mitochondria-rich cells in gills of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) adapted to fresh water or sea water: quantification by confocal laser scanning microscopy. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v.200, p.55-64, 1997.

VERSOLATO, B. A. A ameaça que vem da água. **O Estado de São Paulo**: São Paulo, 22 de março de 2009. V.H, p.11. (Caderno Especial: Sustentabilidade)

VERSOLATO, B. A. Alerta no único rio limpo de SP. **O Estado de São Paulo**: São Paulo, 22 de março de 2009. V.H, p.10. (Caderno Especial: Sustentabilidade)

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

WHITE, P. A.; RASMUSSEN, J. B. The toxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 410, p. 223-236, 1998.

WOOD, C. M. Branchial Ion and acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. **Physiological Zoology**, Woodlawn, v. 64, n. 1, p. 68-102, 1991.

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

Rio Claro, 17 de dezembro de 2009

Luciana Tendolini Brito

Carmem S. Fontanetti