THAYZI DE OLIVEIRA ZENI

O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do grau de Doutora em Zoologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Ostrensky
Coorientadora: Gisele Geraldine Castilho Westphal

CURITIBA

2016

THAYZI DE OLIVEIRA ZENI

O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas

Aprovação CEUA – 23075.064636/2015-04

CURITIBA

2016

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em ZOOLOGIA
Código CAPES: 40001016008P4

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ZOOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Tese de Doutorado de **THAYZI DE OLIVEIRA ZENI**, intitulada: "**O uso da histopatologia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 25 de Fevereiro de 2016.

Prof ANTONIO OSTRENSKY NETO (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof ANTONIO WALDIR CUNHA DA SILVA (UFPR)

Prof DANIEL BUSSOLARO (IFPR)

Prof ERICA PAULS (FEPAR)

Prof LUCIANA RODRIGUES SOUZA BASTOS (INPA)

Sumário

Sumário i

Lista de Tabelas vi

Lista de Figuras x

Apresentação 1

Resumo geral 1

Geral abstract 2

Introdução 3

O uso da histopatologia na avaliação de peixes 3

Espécies utilizadas no estudo 4

Agentes utilizados durante a realização dos experimentos 6

Protozoário Ichthyophthirius multifiliis 6

Sal iodado 8

Amônia 9

Hipóteses 10

Objetivo 11

Estrutura 11

Capítulo 1. Limitações e potencialidades da histopatologia como ferramenta de biomarcação da exposição de peixes a estressores ambientais 12

Resumo 12

Palavras-chave: brânquias, fígado, índices histopatológicos, revisão de literatura, rim 12

Abstract 12

Keywords: 13

Introdução 13

Exposição de peixes a xenobióticos de origem antropogênica 15

Órgãos-alvo e efeitos observados em peixes, após a exposição a xenobióticos de origem antrópica 17

Brânquias 21

Fígado 26

Rim 31

Métodos analíticos quantitativos empregados na histopatologia de peixes 34

Potencialidades e limitações da histopatologia por microscopia de luz 42

Referências 44

Capítulo 2 - Alterações branquiais em Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) e Metynnis maculatus (Kner, 1858) durante tratamento contra a ictiofitiríase 59

Resumo 59

Palavras chave: parasitose, histopatologia, Ichthyophtirius multifiliis, índice de Bernet, índice de Cardoso 60

Abstract 60

Keywords: 60

Introdução 60

Material e Métodos 62

Análises estatísticas 66

Resultados 66

Qualidade de água 66

Análises macroscópicas e histopatológicas 68

Aplicação dos índices de alteração tecidual..... 72

Discussão 75

Referências..... 80

Capítulo 3 - Efeitos do sal iodado na histopatologia branquial e hepática de jundiás (Rhamdia quelen) e de pacus (Metynnis maculatus) 84

Resumo..... 84

Palavras-chave: substância de referência, biomarcador, sensibilidade 84

Abstract 84

Keywords: reference substance, biomarker, sensitivity 85

Introdução 85

Material e Métodos..... 87

Acondicionamento dos exemplares 87

Período experimental 88

Histopatologia 91

Análises estatísticas..... 94

Resultados..... 95

Exposição aguda..... 95

Exposição subcrônica 97

Discussão 107

Referências..... 114

Capítulo 4. Efeitos da amônia nas estruturas teciduais branquial e hepática de jundiás (Rhamdia quelen) e de pacus (Metynnis maculatus) 119

Resumo..... 119

Palavras chave: alterações teciduais, biomarcador, índice de Bernet, índice de Cardoso. 119

Abstract 119

Introdução 120

Material e Métodos 122

Obtenção e acondicionamento dos exemplares 122

Testes de toxicidade 123

Teste de referência 124

Experimento agudo 124

Experimento subcrônico 125

Análise histológica 126

Análises estatísticas 129

Resultados 129

Exposição aguda 130

Exposição subcrônica 131

Histologia hepática 138

Discussão 142

Referências 147

Considerações gerais 166

Agradecimentos 168

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Tabela 1. Artigos utilizados na revisão bibliográfica com enfoque em alterações teciduais causadas por xenobióticos em peixes..... 17

Tabela 2. Alterações histopatológicas do tecido branquial de peixes, expostos à diferentes substancias, descritas em diferentes artigos (n=40)..... 23

Tabela 3. Alterações histopatológicas do tecido hepático de peixes, expostos à diferentes substancias, descritas em diferentes artigos (n=29)..... 28

Tabela 4. Alterações histopatológicas do tecido renal de peixes, expostos à diferentes substancias, descritas em diferentes artigos (n=16)..... 32

Capítulo 2

Tabela 5. Média (desvio padrão) dos valores quantificados de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD) (mg/L), pH, nitrito (NO_2) (mg/L), amônia total (N-AT= NH_3+NH_4^+) (mg/L) e amônia não ionizada (N-NH^3) (mg/L) nos tanques de manutenção de peixes ao longo do tratamento contra ictiofitiríase..... 67

Tabela 6. Variação temporal do número de indivíduos mortos e comportamento dos peixes infestados por *Ichthyophtirius multifiliis* durante tratamento medicamentoso..... 67

Tabela 7. Alterações observadas em tecido branquial de *Rhamdia quelen* (jundiás) e *Mettynis maculatus* (pacus) infestados por *Ichthyophtirius multifiliis*. 68

Tabela 8. Frequência (%) de exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* com alteração branquial após infestação por *Ichthyophtirius multifiliis*..... 72

Tabela 9. Grau de lesões observadas para os índices de Bernet (I org), Cardoso (IIBRT) e Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) (p<0,05) aplicados para *Rhamdia quelen* (Rq) e *Metynnis maculatus* (Mm) infestados pelo parasito *Ichthyophtirius multifiliis*..... 74

Capítulo 3

Tabela 10. Mediana (mínimo e máximo) dos valores quantificados de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD) (mg/L), pH, amônia total (N-AT= NH_3+NH_4^+) (mg/L) e amônia não ionizada (N-NH^3) (mg/L) nos experimentos de exposição de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* ao sal iodado. 95

Tabela 11. Mediana (mín-máx) dos valores de oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia total (N-AT= NH 3+NH4 +) (mg/L) e amônia não ionizada (N-NH3) (mg/L) no experimento de exposição aguda ao sal iodado para as espécies *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*[*]..... 97

Tabela 12. Frequência (em %) de exemplares de *Rhamdia quelen* (jundiá) e *Metynnis maculatus* (pacu) com alterações branquiais nos grupos controle e tratamentos expostos ao sal iodado (NaCl). As letras indicam resultados significativamente distintos (p<0,05) entre tratamentos e controle de acordo com teste de proporções realizado. 100

Tabela 13. Índices de Alterações Branquiais propostos por Cardoso (2006) (IIBrT), por Bernet, Schmidt et al. (1999) (I_{org}) e por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994)(p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição ao

sal iodado (NaCl) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*. 102

Tabela 14. Frequência (em %) de exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* com alterações hepáticas nos grupos controle e também nos tratamentos expostos ao sal iodado (NaCl). As letras indicam resultados significativamente diferentes (p<0,05) entre tratamentos e controle de acordo com teste de proporções realizado. 104

Tabela 15. Índices de Alterações Hepáticas propostos por Cardoso (2006) (IIHT) e por Bernet, Schmidt et al. (1999) (I_{org}) (p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição ao sal iodado (NaCl) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*. 106

Capítulo 4

Tabela 16. Mediana dos Índices de Impactos Braquiais (IIBr) e (entre parênteses) o número total de alterações observadas em exemplares de *Rhamdia quelen* (1) e de *Metynnis maculatus* (2) nos controles e nos tratamentos expostos à amônia. As letras indicam resultados significativamente distintos (p<0,05) entre tratamentos de exposição e controle, de acordo com teste de Mann Whitney, bem como o resultado da comparação entre os índices agrupados (tratamento de exposição + controle) para as duas espécies (1x2). 134

Tabela 17. Índices de Alterações Branquiais propostos por Cardoso (2006) (IIBrT), por Bernet, Schmidt et al. (1999) e por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994)(I_{org}) (p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição à

amônia (em forma de cloreto de amônio) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*..... 137

Tabela 18. Mediana dos Índices de Impactos Hepáticos (IIH) e (entre parênteses) o número total de alterações observadas em exemplares de *Rhamdia quelen* (1) e de *Metynnis maculatus* (2) nos controles e nos tratamentos expostos à amônia. As letras indicam resultados significativamente distintos (p<0,05) entre exposição e controle, de acordo com teste de Mann Whitney, bem como o resultado da comparação entre os índices agrupados (exposição + controle) para as duas espécies (1x2). 139

Tabela 19. Índices de Alterações Hepáticas propostos por Cardoso (2006) (IIHT), e por Bernet, Schmidt et al. (1999) (I_{org}) (p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição à amônia (mg/L de N- AT) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*..... 141

Tabela 20. Alterações observadas no tecido branquial em exemplares de *R. quelen* e *M. maculatus*. ..... **Erro! Indicador não definido.**

Lista de Figuras

Apresentação

Figura 1. Fotografia de exemplar de *Rhamdia quelen* utilizado nos estudos de histopatologia. Barra de escala = 4 cm (Fonte: Bastos (2011). 5

Figura 2. Fotografia de exemplar de *Metynnis maculatus* utilizado nos estudos da histopatologia. 5

Figura 3. Ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis*. Ilustração retirada de Pádua, Menezes-Filho et al. (2012). 7

Capítulo 1

Figura 4. Ocorrência de alterações teciduais em brânquias, fígado e rim causadas por xenobióticos em peixes. 20

Figura 5. Fases do metabolismo hepático de xenobióticos. 27

Capítulo 2

Figura 6. Fotomicrografia de brânquias infestadas por *Ichthyophthirius multifiliis* e coradas com HE (hematoxilina e eosina). A) brânquias com morfologia normal; B) parasita; C) aneurisma; D) congestão; E) descamação de epitélio; F) perda de adesão epithelial; G) edema; H) lamela em regeneração; I) epiteliocistose; J) fusão; K) hemorragia; L) hiperplasia; M) hipertrofia e N) vacuolisação..... 71

Figura 8. Evolução dos índices branquiais (mediana, 40-60%) observadas para *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* infestados pelo parasito *Ichthyophtirius multifiliis*. A. Índice do Órgão (I org), B. IIBRT (Índice de Impacto Branquial

Total). C. IAH (Índice de Alterações Histológicas). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) para cada espécie estudada, pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05). 74

Capítulo 3

Figura 9. CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança, do sal iodado para (A) *Rhamdia quelen* e para (B) *Metynnis maculatus*. 96

Figura 9. Fotomicrografia de brânquias de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* expostos ao sal iodado e corados com HE (hematoxilina e eosina). A) Acúmulo de pigmento; B) Aneurisma; C) Congestão vascular; D) Descamação epitelial; E) Epithelial lifting; F) Edema; G) Lamela em regeneração; H) Fusão de lamelas; I) Hemorragia; J) Hiperplasia de epitélio; K) Hipertrofia de epitélio; L) Parasitas. 99

Figura 10. Fotomicrografia de fígado de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* expostos ao sal iodado e corado com HE (hematoxilina e eosina). A) Acúmulo de pigmento; B) Congestão vascular; C) Degeneração macroveseicular; D) Degeneração hialina; E) Degeneração hidrópica; F) Edema e G) Hemorragia. 103

Capítulo 4

Figura 11. Variação da $CL_{50,}$ e seus respectivos intervalos de confiança da (A e B) amônia total (mg/L de N-AT) e (C e D) amônia não ionizada (mg/L de N-NH_3) para *Rhamdia quelen* (esquerda) e *Metynnis maculatus* (direita). 130

Figura 12. Índice de Impacto Branquial (IIBr) em A. *Metynnis maculatus* para a alteração hiperplasia de epitélio e B. *Rhamdia quelen* para a alteração congestão..... 135

Apresentação

Resumo geral

A histopatologia por microscopia de luz é uma ferramenta bastante usada em estudos dos efeitos agudos e crônicos de xenobióticos em peixes e também na caracterização de enfermidades que os acometem. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da histopatologia por microscopia de luz como biomarcador da exposição de peixes a diferentes agentes estressores, utilizando para isso índices analíticos quantitativos de impactos teciduais. A tese foi dividida em quatro capítulos. O primeiro é um artigo de revisão bibliográfica que aborda o uso da histopatologia de luz como ferramenta de análise branquial, hepática e renal em peixes. Foram analisados 50 artigos, que registraram a ocorrência de 32 alterações branquiais, 46 hepáticas e 40 renais. A presença destas alterações, entretanto, não foi relacionada a um tipo específico de agente estressor. A análise evidenciou divergências com relação à metodologia analítica adotada por diferentes autores, dificuldades no uso da nomenclatura descritiva de determinadas lesões e relacionados ao uso de diferentes índices histopatológicos quantitativos. O segundo capítulo teve por objetivos descrever e quantificar as alterações teciduais observadas em exemplares de *Rhamdia quelen* (jundiá) e em *Metynnis maculatus* (pacu) durante o tratamento contra a ictiofitiríase. Para isso foram utilizados três índices: o Índice do Órgão (I_{org}), o Índice de Impacto Branquial (IIBr) e o Índice de Alterações Histológicas (IAH) (os mesmos índices foram aplicados nos capítulos 3 e 4). Não foi possível estabelecer uma relação de nexo causal entre as alterações observadas e a parasitose analisada. Foram evidenciadas diferentes respostas teciduais apresentadas pelas brânquias das diferentes espécies, quando do uso desses diferentes índices. O terceiro capítulo objetivou testar a sensibilidade de *R. quelen* e *M. maculatus* ao sal iodado e utilizar a histopatologia branquial e hepática como biomarcador da exposição dos animais ao sal. Foram registradas 10 alterações branquiais, além da presença do parasito *I. multifiliis*. Para exemplares de *R. quelen*, os animais expostos ao sal apresentaram maior prevalência de congestão, perda de adesão epitelial e edema que os animais do grupo controle. Os índices analisados de forma agrupada mostraram que os índices I_{org} e IIBrT foram superiores para exemplares de *M. maculatus* enquanto que o IAH, foi superior para *R. quelen*. Para *R. quelen*, congestão hepática foi mais prevalente no tratamento do que no controle, sugerindo a ocorrência de um desequilíbrio hidroeletrolítico como fator desencadeador da congestão. No último capítulo foi testada a sensibilidade de *R. quelen* e *M. maculatus* à amônia e avaliada as respostas histopatológicas branquiais e hepáticas derivadas da exposição dos animais a este composto. Nas brânquias foram registradas 13 lesões teciduais. Em exemplares de *M. maculatus* foi observado o aumento do IIBrT da alteração hiperplasia de epitélio de acordo com o aumento da concentração de amônia. Para *R. quelen* o mesmo foi observado para congestão. Nenhuma das alterações observadas no fígado foi relacionada à concentração de amônia. Os índices I_{org} e IIBrT analisados de forma agrupada mostram valores superiores para exemplares de *M. maculatus.* Entretanto, quando usado o IAH, valor superior foi observado para *R. quelen*.

Geral abstract

The histopathology by light microscopy is a widely used tool in studies of acute and chronic effects of xenobiotics in fish and also the characterization of diseases that affect. The objective of this study was to evaluate the efficiency of histopathology by light microscopy as a biomarker of exposure of fish to different stressors, making use of quantitative analytical indices of tissue impacts. The thesis was divided into four chapters. The first is a literature review article that discusses the use of light histopathology as gill analysis tool, liver and kidney in fish. 50 articles that reported the occurrence of 32 gill changes, 46 liver and 40 kidney were analyzed. The presence of these changes, however, was not related to a specific type of stressor. The analysis showed differences regarding the analytical methodology used by different authors, difficulties in the use of descriptive nomenclature of certain injuries and related to the use of different quantitative histopathology indices. The second chapter aimed to describe and quantify tissue changes observed in specimens of R. quelen (silver catfish) and Metynnis maculatus (pacu) during treatment against ictiofitiríase. For this we used three indices: the Board Index (Iorg), the Branchial Impact Index (BII) and Histopathological Alteration Index (HAI) (the same indexes were later applied in Chapters 3 and 4). Could not establish a causal relationship between the alterations observed and analyzed parasitosis. They were shown different tissue responses submitted by the gills of different species, when the use of these different rates. The third chapter aimed to test the sensitivity of R. quelen and M. maculatus to iodized salt and use the gill and liver histopathology as a biomarker of exposure of animals to salt. It recorded 10 gill changes and the presence of the parasite I. multifiliis. For copies of R. quelen, animals exposed to salt had a higher prevalence of congestion, loss of epithelial adhesion and edema than the control group. The indexes analyzed in an aggregated manner showed that Iorg and BIIT indexes were higher for M. maculatus copies while the HAI, was superior to R. quelen. For copies of R. quelen, liver congestion was more prevalent in treatment than in the control, suggesting the occurrence of an electrolyte imbalance as triggering factor of congestion. In the last chapter we tested the sensitivity of R. quelen copies and M. maculatus to ammonia and evaluated the gill and liver histopathologic responses derived from animal exposure to this compound. In the gills were recorded 13 tissue lesions. In M. maculatus specimens was observed the increase in epithelial hyperplasia BIIT changes according to the concentration of ammonia. R. quelen the same was observed for congestion. In relation to the liver five tissue changes were identified. None of them, however, was related to the concentration of ammonia. The Iorg and BIIT indices analyzed in grouped form show higher values for M. maculatus copies. However, when used HAI, higher than was observed for R. quelen.

Introdução

O uso da histopatologia na avaliação de peixes

A histopatologia por microscopia de luz ou histologia patológica é o estudo microscópico dos tecidos doentes e/ou lesados. Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada como uma ferramenta de análise dos efeitos da exposição de peixes a xenobiótico, em diagnósticos de impactos ambientais e em estudos envolvendo as mais variadas doenças. A preferência por essa ferramenta se dá devido a fatores como a facilidade de aplicação do método, a rapidez de sua aplicação, aos custos relativamente reduzidos que estão envolvidos nessas análises (Johnson, Stehr et al. 1993) e, principalmente, na relação direta entre os agentes estudados e os efeitos celulares e teciduais por eles provocados (Van Der Oost R., Beyer et al. 2003, Cengiz and Unlu 2006).

No presente estudo a histopatologia por microscopia de luz é estudada em brânquias, fígado e rim. As brânquias exibem extensas superfícies que estão permanentemente em contato com o ambiente externo, por isso foram base para vários estudos (Winkaler, Silva et al. 2001, Costa, Diniz et al. 2009, Montes, Ferrerira et al. 2010). Elas atuam como interface seletiva entre os ambientes interno e externo e possuem células de muco, que desempenham importante papel na proteção do epitélio a substâncias tóxicas e patogênicas. Além disso, as brânquias também atuam na fisiologia da osmorregulação e na troca de gases (Bernet, Schmidt et al. 1999). O fígado, por sua vez, destaca-se por seu potencial de biotransformação, bioativação e excreção de xenobiontes, podendo refletir a exposição aos contaminantes de modo eficiente (Bernet, Schmidt et al. 1999). Já a porção posterior do rim está envolvida em processos de regulação osmótica e iônica, além de ser o

principal responsável pelo transporte de íons divalentes (Randall, Burggren et al. 1999).

Para avaliar os danos teciduais nos mencionados tecidos, são utilizados os índices histopatológicos. Estes utilizam fórmulas permitindo assim uma avaliação numérica e comparação dos dados de diferentes estudos. O índice proposto por Bernet, Schmidt et al. (1999) baseia-se na extensão e na relevância patológica da alteração observada enquanto que o proposto por Cardoso (2006) considera a ocorrência e prevalência das lesões. O índice de Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994), por sua vez, considera o comprometimento das funções do órgão analisado.

Espécies utilizadas no estudo

Além do uso de espécies já consideradas como modelos em estudos com peixes de água doce (como *Danio rerio* e *Pimephales promelas*), tem crescido o interesse pelo uso de espécies como *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus,* que foram utilizadas neste estudo.

O jundiá (*Rhamdia quelen* - Siluriformes, Heptapteridae) é um bagre que apresenta-se amplamente distribuído na América do Sul e Central, ao leste dos Andes e entre a Venezuela e o Norte da Argentina (Silfvergrip 1996) (Figura 1). Este bagre vive em lagos e rios em ambientes de águas calmas, com fundo de areia ou lama onde se escondem entre troncos e pedras (Gomes, Golombieski et al. 2000). Além disso, é uma espécie de grande importância para a piscicultura da região Sul do Brasil (Behr, Neto et al. 1999).

Figura 1. Fotografia de exemplar de *Rhamdia quelen* utilizado nos estudos de histopatologia. Barra de escala = 4 cm (Fonte: Bastos (2011).

O *Metynnis maculatus,* por sua vez, é popularmente conhecido como pacu, (Teleostei, Characidae) (Figura 2). São animais endêmicos da América do Sul, nativos do Paraguai e das Bacias Amazônicas (Kullander 2003) além de estarem amplamente distribuídos em rios e reservatórios de todo o Brasil (Cunico, Graça et al. 2002, Ramos, Vidotto-Magnani et al. 2008, Meschiatti and Arcifa 2009, Terra 2009).

Figura 2. Fotografia de exemplar de *Metynnis maculatus* utilizado nos estudos da histopatologia.

Ambas as espécie são cultivadas na região metropolitana de Curitiba, estando disponíveis na Central de Abastecimento do Paraná S/A (Ceasa).

Agentes utilizados durante a realização dos experimentos

Protozoário Ichthyophthirius multifiliis

A ictiofitiríase é uma doença causada por um protozoário ciliado, *Ichthyophthirius multifiliis*, popularmente conhecido por ictio (Xu, Shoemaker et al. 2012). Esta é conhecida por “doença dos pontos brancos”, visto que o sinal clínico mais evidente é a presença de pontos brancos na pele, nas nadadeiras, na córnea, na cavidade bucal e também nas brânquias dos peixes (Pádua, Menezes-Filho et al. 2012).

Segundo Pádua, Menezes-Filho et al. (2012) o ciclo de vida de *I. multifiliis* é caracterizado por fases. A fase de teronte (30 x 50 µm) é caracterizada por um protozoário de natação livre o qual parasita o peixe. Após penetrar no hospedeiro este vira um trofonte o qual se alimenta e cresce (800 a 1000 µm). O parasito sai do peixe na forma de um tomonte maturo, o qual ira secretar um cisto de proteção. Este é capaz de fixar-se em substratos enquanto, dentro deste, ocorrem divisões formando de 500 a1000 células-filhas, chamadas de tomitos. Os tomitos, por sua vez, irão diferenciam-se em terontes infectantes, os quais perfuram a parede do cisto e entram na água com natação livre, em busca de um novo hospedeiro para completar o ciclo (Figura 3).

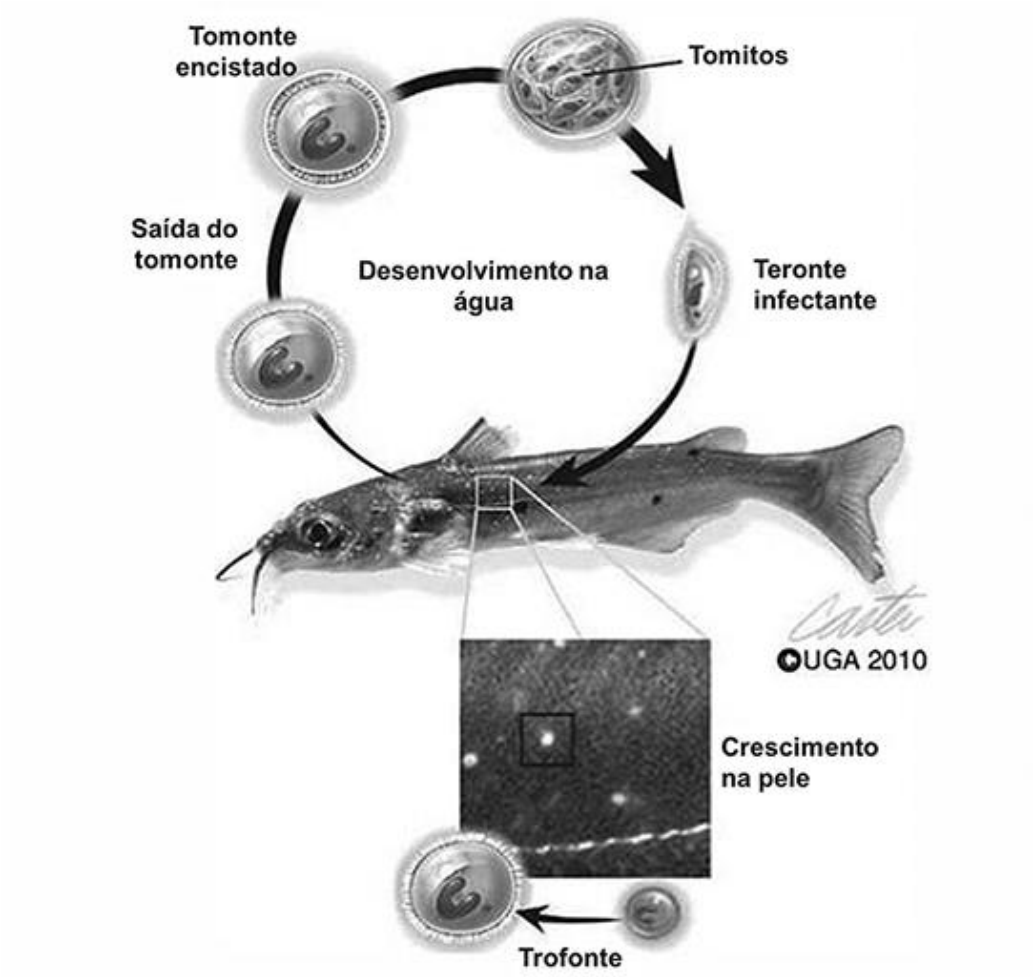


Figura 3. Ciclo de vida do *Ichthyophthirius multifiliis*. Ilustração retirada de Pádua, Menezes-Filho et al. (2012).

A forma de transmissão do parasito geralmente ocorre de forma horizontal. Isso ocorre quando um peixe parasitado infesta o restante dos indivíduos. Tem-se, portanto, que a água de cultivo atua como veículo desses parasitos, assim como os instrumentos utilizados na rotina dos tanques, tais como puçás, peneiras, redes de arrasto e até mesmo a pessoa que manipulou estes materiais.

Este parasito causa perdas econômicas em cultivos de peixes de água de doce, visto que não apresenta especificidade parasitária e apresenta distribuição mundial (Borba 2005, Woo 2006). Por este motivo vários são os tratamentos químicos testados no combate a este parasito. Dentre eles destacam-se a formalina (Klein, Aldi Feiden et al. 2004, Noga 2010), o sal (Klein, Aldi Feiden et al. 2004,

Andrade, Andrade et al. 2006, Noga 2010), a formalina adicionada a verde malaquita (Noga 2010), o cloranfenicol, o cloranfenicol adicionado com sal, a oxitetraciclina, a oxitetraciclina adicionado com sal (Andrade, Andrade et al. 2006) o permanganato de potássio (Klein, Aldi Feiden et al. 2004) e o sulfato de cobre (Carneiro, Schorer et al. 2005).

Segundo Carneiro, Cirio et al. (2006) a infecção pelo ictio ocorre de forma muito rápida e intensa, podendo ocasionar alterações anatomopatológicas severas no tecido branquial além de altas taxas de mortalidade em curto período de tempo. Visto que as brânquias apresentam grande importância na homeostase dos peixes e esta estrutura é acometida pelo parasito, procurou-se evidenciar no presente estudo a caracterização histopatológica das alterações branquiais provocadas pelo parasito *Ichthyophthirius multifillis*.

Sal iodado

Testes de toxicidade são experimentos laboratoriais, os quais são realizados sob condições experimentais específicas e controladas. Estes tem por objetivo estimar a toxicidade de xenobiontes. Para avaliar a sensibilidade de uma população de organismos a qual será utilizada em testes de toxicidade, e também para estimar a precisão e confiabilidade dos dados produzidos em laboratório são utilizadas substâncias de referência (CANADA 1990). Esta substância é empregada para se realizar comparações entre os resultados obtidos em testes de toxicidade, na calibração interlaboratorial, na comparação de métodos que usam diferentes organismos e na avaliação de reprodutibilidade e validação de testes de toxicidade (Hunt and Anderson 1989, Resgalla Jr. and Laitano 2002). O uso destas sustâncias pode também revelar diferenças na sensibilidade de diferentes lotes de um mesmo

organismo-teste em função de fatores como aclimatação, ocorrência de doenças, densidade utilizada e nível de estresse a que os organismos foram submetidos antes da realização dos testes (Ong and Din 2001).

O sal refinado iodado em excesso pode ser tóxico aos peixes (He, Fu et al. 2014), entretanto, se este for usado corretamente é seguro tanto para os peixes, quanto para os ecossistemas aquáticos (Altinok and Grizzle 2003, Garcia, Becker et al. 2007, Wangen 2012).

No presente estudo o sal foi escolhido para ser utilizado como substância de referência visto que é um xenobiótico amplamente utilizado na aquicultura tanto no tratamento de doenças quanto no transporte de peixes.

Amônia

A amônia é facilmente encontrada no ambiente aquático. Ela é o principal resíduo nitrogenado do catabolismo proteico de peixes e de outros organismos aquáticos (Nerici, Silva et al. 2012, Wright and Wood 2012). É principalmente eliminada por meio do epitélio branquial, por difusão passiva na forma não ionizada (NH_3) (Wilkie 1997, Evans, Piermarini et al. 2005). Também é resultante da decomposição de matéria orgânica e de emissões industriais (Wilkie 1997, Saha and Ratha 1998, Randall and Tsui 2002).

Quando em meio aquoso, a amônia pode ser encontrada nas formas ionizada (NH_4^+) e não ionizada (NH_3). A soma destas é chamada de amônia total (AT= NH_3 + NH_4^+) (Thurston and Russo 1983). Ambas são tóxicas para os peixes, porém o NH_3 apresenta maior toxicidade em função da sua capacidade de se difundir por meio das membranas branquiais, graças à ausência de carga elétrica e à sua solubilidade lipídica. Já a forma iônica é usualmente hidratada e não consegue se difundir por

meio dos microporos hidrofóbicos das membranas branquiais (Benli, Köksal et al. 2008).

Dentre as consequências da exposição de peixes à amônia, estão a elevação de parâmetros sanguíneos (Wendelaar Bonga 1997), dificuldade de excreção, levando a um aumento do nível de amônia no sangue e nos tecidos e causando danos fisiológicos severos (Boyd and Tucker 1998); danos ao epitélio branquial, com o consequente aumento de dificuldade na realização de trocas gasosas (Durborow, D.M. et al. 1997) e morte (Randall and Tsui 2002). Segundo Tomasso (1994) a exposição de peixes a amônia pode causar alterações hormonais, metabólicas, iônicas e hematológicas características de peixes em condição de estresse.

Por estes motivos a manutenção da qualidade da água e consequentemente da concentração de amônia nela são fatores muito importantes em sistemas de cultivo e também durante o transporte dos peixes. Sendo assim é de suma importância conhecer as alterações teciduais que os peixes expostos a esse xenobiótico podem apresentar.

Hipóteses

1) Peixes com ictiofitiríase apresentam alterações brânquias relacionadas à presença do parasito.

2) Peixes expostos ao sal iodado e à amônia apresentam alterações teciduais branquiais e hepáticas relacionadas ao xenobiótico testado.

3) As alterações teciduais branquiais e hepáticas aumentarão a medida em que a concentração do sal e da amônia aumentarem.

4) As diferentes espécies utilizadas apresentam as mesmas alterações teciduais quando expostos ao sal iodado e a amônia.

5) Os índices histopatológicos quantitativos permitem determinar a intensidade dos danos teciduais branquiais e hepáticos proporcionalmente às concentrações de xenobióticos testadas.

Objetivo

Avaliar a eficiência da histopatologia por microscopia de luz como biomarcador da exposição de peixes a diferentes agentes estressores, utilizando a descrição das alterações assim como índices analíticos quantitativos de impactos teciduais.

Estrutura

Este trabalho está estruturado em quatro capítulos. No **primeiro**, é feito uma revisão de literatura sobre as potencialidades e as limitações da histopatologia por microscopia de luz, em estudos envolvendo brânquias, fígado e rins de peixes.

No **capítulo 2** foi realizada uma avaliação das alterações teciduais identificadas em brânquias de jundiás (*R. quelen*) e de pacus (*M. maculatus*) tratados contra a parasitose causada pelo protozoário *Ichthyophthirius multifiliis*.

No **capítulo 3** são apresentados experimentos conduzidos com jundiás *e pacus* com o objetivo de determinar a concentração letal (CL_{50}) da exposição assim como as respostas teciduais causadas nas brânquias e fígado destes animais durante a exposição subcrônica ao sal iodado.

No **capítulo 4** a mesma metodologia é aplicada, porém utilizando a amônia, substância considerada como um dos mais importantes poluentes presentes nos ambientes aquáticos continentais.

Capítulo 1. Limitações e potencialidades da histopatologia como ferramenta de biomarcação da exposição de peixes a estressores ambientais

Resumo

A histopatologia ou histologia patológica estuda como uma doença ou xenobióticos específicos afetam um conjunto de células (tecido). O presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de uma revisão de artigos científicos, as limitações e potencialidades da histopatologia branquial, hepática e renal como biomarcador da exposição de peixes a estressores ambientais. Foram analisados 50 artigos, os quais reportaram a ocorrência de 118 lesões teciduais, sendo 32 branquiais, 46 hepáticas e 40 renais. Entretanto, verificou-se não haver alterações teciduais patognomônicas para os contaminantes avaliados. Foram observadas grandes variações entre os estudos com relação a metodologia analítica empregada, principalmente em relação à forma e ao período de exposição dos animais ao agente estressor estudado, o período de aclimatação dos peixes antes do início dos experimentos, o número de animais utilizados em cada unidade assim como o tratamento experimental. Foram ainda identificadas evidentes dificuldades, por parte de alguns autores, na definição da nomenclatura adotada e na própria descrição das lesões por eles observadas. O uso dos diferentes índices histopatológicos quantitativos, assim como as adaptações descritas por diferentes autores nesses índices, também dificultam a comparação entre os dados apresentados.

Palavras-chave: brânquias, fígado, índices histopatológicos, revisão de literatura, rim

Abstract

Histopathology and pathological histology is the study of how a specific disease affects a set of cells (tissue). This study aimed to evaluate, through a previously published review of research, the limitations and potential of histopathology of gill, liver and kidney as a biomarker of exposure of fish to environmental stressors. Fifty articles were analyzed. They reported the occurrence of 113 tissue lesions, 32 in the gill, 47 in the liver and 40 in the kidney. However, there was no pathognomonic tissue changes for evaluated contaminants. Were also observed large variations between the studies in the analytical methodology used, especially regarding the form and period of exposure of animals to study stressor, fish acclimation period before the beginning of the experiments, the number of animals used in each unit and experimental treatment. Difficulties were also identified evident by some authors in the definition of the adopted nomenclature and in the very description of the injuries they observed. The use of different quantitative histopathological indices as well as

adjustments promoted by different authors in these rates also make it difficult to compare the data presented.

Keywords:, gills, histopathological indices, kidney, literature review, liver

Introdução

A histopatologia ou histologia patológica é o estudo microscópico dos tecidos doentes e/ou lesados. Muitas são as técnicas histopatológicas existentes, como, por exemplo, a microscopia óptica (ou de luz), a microscopia eletrônica de varredura e a microscopia eletrônica de transmissão.

A histopatologia por microscopia de luz é realizada por meio de análises óticas de amostras de tecidos que foram previamente seccionados, corados e montados sobre uma lâmina, de modo a manter a integridade celular mesmo após a morte do organismo (Tolosa, Rodrigues et al. 2003).

Dentre as aplicações da histopatologia em peixes, destacam-se a avaliação dos efeitos da exposição dos organismos a xenobióticos, tais como metais pesados (Al-Bairuty, Shawa et al. 2013, Arya and Sharma 2015) e inseticidas (Garcia-Santos, Monteiro et al. 2007, Mota, Henrique et al. 2015); a realização de estudos de avaliação ambiental utilizando animais como bioindicadores (Amiri, Roudsari et al. 2011, Ameur, El Megdiche et al. 2015); de estudos reprodutivos (Akhavana, Falahatkara et al. 2015, Ohta and Ebisawa 2015), de estudos nutricionais (Mourente, Good et al. 2007, Evans, Pasnik et al. 2010) e de avaliação de doenças (Ferraz de lima, Reis et al. 1991, Carneiro, Cirio et al. 2006).

As características histopatológicas de órgãos-alvos podem expressar condições ambientais específicas e representar tanto o tempo quanto a intensidade de exposição dos organismos a alterações ou a estressores ambientais (Maceda-Veiga, Monroy et al. 2013, Ameur, El Megdiche et al. 2015). Por isso, a

histopatologia tem sido amplamente utilizada como ferramenta de biomarcação de impactos ambientais (Hinton, Baumann et al. 1992, Bernet, Schmidt et al. 1999, Maceda-Veiga, Monroy et al. 2013, Ameur, El Megdiche et al. 2015).

Essa é uma ferramenta que pode ser utilizada isoladamente ou em conjunto com outros biomarcadores como, por exemplo, metalotioneínas (Giguère, Campbell et al. 2005, Bervoets, Knapen et al. 2013); marcadores hematológicos (Sampaio, Boijink et al. 2010, Li, Veliseka et al. 2011, Saravanan, Kim et al. 2015); proteínas de estresse (Ceyhun, M. et al. 2010, Dalvi, Pal et al. 2012, Rajeshkumar, Sukumar et al. 2014) e testes de micronúcleo (Kumar, Kesari et al. 2013, Polettaa, Larriera et al. 2009).

Os peixes, por sua vez, são comumente utilizados como bioindicadores das condições ambientais, tanto em estudos sobre a qualidade de água (Khanna, Sarka et al. 2007, Nogueira, Castro et al. 2008) como do ambiente como um todo (Vieira and Shibatta 2007, Naigaga, Kaiser et al. 2011). Também são empregados em estudos que envolvem exposição a xenobióticos (Winkaler, Silva et al. 2001, Flores-Lopes and Thomaz 2011), podendo ser empregados em análises realizadas *in loco* (Troncoso, Cazenave et al. 2012, Valon, Valbona et al. 2013) e também em ensaios laboratoriais (Hued, Oberhofer et al. 2012, Arya and Sharma 2015).

O presente estudo teve como objetivo avaliar, por meio da revisão de pesquisas, as limitações e as potencialidades do uso da histopatologia branquial, hepática e renal como biomarcador da exposição de peixes à estressores ambientais.

Exposição de peixes a xenobióticos de origem antropogênica

Uma vez presente no ambiente aquático, xenobióticos podem ser absorvidos por peixes teleósteos através das vias digestória (ingestão de água e alimentos), branquial e cutânea, sendo as duas primeiras as principais (Sens 2009).

Metais pesados, por exemplo, ocorrem naturalmente no ambiente e alguns deles são considerados essenciais para a realização de processos biológicos, tais como: o ferro, que é essencial no transporte de oxigênio pela hemoglobina e na respiração celular (Lim, Klesius et al. 2000); o cobre, usado na produção de energia, proteção celular contra radicais livres, síntese de colágeno e produção de melanina; e o zinco, na regulação do metabolismo de carboidratos, proteína e lipídios (Lall 2002). Porém, em elevadas concentrações, os metais pesados podem ser altamente tóxicos (Kennish 1991, Heath 1995, Dallinger and Raimbow 2003), matando ou causando severas doenças em peixes (Handy and Penrice 1993, Dias, Maiorino et al. 2007, Fernandes, Cardoso et al. 2007, Monteiro, Rocha et al. 2008, Abdel-Warith, Younis et al. 2011, Al-Bairuty, Shawa et al. 2013, Arya and Sharma 2015). De acordo com Heath (1995) os metais pesados, podem se acumular nas brânquias, fígado, rim e músculos. O fígado e o rim, porém, têm a capacidade de biotransformar esses poluentes através de processos enzimáticos, tornando-os hidrossolúveis e possibilitando sua excreção através da pele, do muco, no intestino pelas fezes, no rim, pela urina ou mesmo nas brânquias por difusão passiva.

Os agrotóxicos, por sua vez, são bastante estudados em função da sua ampla utilização na agriculatura e por representarem grandes riscos ambientais, inclusive para espécies não-alvo (Albinati 2009), incluindo os próprios seres humanos (Fernandes Neto and Sarcinelli 2009, Rangel, Rosa et al. 2011). Entre os agrotóxicos mais comumente testados em peixes estão aqueles à base de glifosato

(Langiano and Martinez 2008, Albinati 2009, Hued, Oberhofer et al. 2012, Mota, Henrique et al. 2015), de paration (Fanta, Rios et al. 2003), de carbamato e de endosulfan (Altinok and Grizzle 2003).

Já os efeitos deletérios da exposição de peixes a hidrocarbonetos derivados de petróleo têm sido estudados tanto *in situ*, por exemplo, por meio de coletas em áreas atingidas por vazamento de óleo combustível e óleo diesel (Giari, Dezfuli et al. 2012), óleo bunker e metanol (Katsumiti et al., 2009), quanto em laboratório, avaliando os efeitos tóxicos das frações solúveis (Akaishi, Silva De Assis et al. 2004), totais (Silva, Oliveira-Ribeiro et al. 2009, Kakkar, Saxena et al. 2011, Agamy 2013, Jahanbakhshi and Hedayati 2013) e/ou das emulsões desses hidrocarbonetos (Engelhardt et al., 1981). Além disso, há registros consistentes de que os hidrocarbonetos de petróleo induzem danos estruturais e funcionais as brânquias, fígado, cérebro e gônadas, mesmo em animais expostos a doses ou concentrações sub-letais desses compostos (Mcdonald et al., 1996).

Todas estas substâncias, além de outros xenobióticos, portanto, são capazes de afetar os peixes, causando alterações celulares e teciduais. Nesses casos, a histopatologia por microscopia de luz pode ser aplicada em vários órgãos-alvo, pois é uma técnica de fácil padronização e baixo custo de aplicação. Mas, por outro lado, essa não é uma ferramenta específica para o diagnóstico de um tipo particular de contaminação ou de contaminante. Além disso, como os ambientes aquáticos podem ser expostos a interações complexas de estressores ambientais, a histopatologia pode ser pouco efetiva na identificação de causas específicas de uma determinada lesão ou mesmo de um conjunto de lesões identificadas. Por isso, a realização de experimentos laboratoriais complementares pode ser necessária para identificar a relação entre agentes químicos específicos e as alterações teciduais

observadas em estudos ambientais. Nesse contexto, a aplicação da histopatologia geralmente deve estar associada a outras metodologias de avaliação ambiental, que permitam a identificação da substância impactante.

Órgãos-alvo e efeitos observados em peixes, após a exposição a xenobióticos de origem antrópica

Nas referências utilizadas os artigos deveriam identificar obrigatoriamente cada um dos órgãos analisados, o método de análise de impacto tecidual utilizado, assim como o tipo de estudo (se realizado em condições laboratoriais ou em ambiente natural). Também deveriam descrever as alterações teciduais observadas em animais expostos a xenobióticos e nos grupos controle ou nos animais coletados no ambiente natural (Tabela 1). Ao final foram selecionados 50 artigos.

Tabela 1. Artigos utilizados na revisão bibliográfica com enfoque em alterações teciduais causadas por xenobióticos em peixes.

Artigo número	Referência	Método de análise utilizado*	Xenobiótico	Órgão				Alteração no controle	Tipo de estudo**
				Brânquia	Fígado	Rim	Outro		
1	Abalaka , Fatihu et al. (2015)	4	Extrato etanólico de *Adenium obesum*	X	-	-	X Pele	Sim	Lab.
2	Agamy (2013)	3	Óleo cru e dispersante	X	-	-	-	Não	Lab.
3	Agus, Erkmen et al. (2015)	1	Dinbutyl phthalate (DBP)	X	X	-	-	Não	Lab.
4	Akaishi, Silva De Assis et al. (2004)	1	Óleo cru	X	X	-	-	Sim	Lab.
5	Albinati (2009)	1	Roundup	X	X	X	-	Sim	Lab.
6	Al-Bairuty, Shawa et al. (2013)	1	Cobre	X	X	X	Cérebro intestino e músculo	Não	Lab.
7	Altinok and Capkin (2007)	0	Methiocarb e Endosulfan	X	X	X	Cérebro	Não	Lab.
8	Ameur, El Megdiche et al. (2015)	0	Poluentes persistentes	X	-	-	-	Não	Amb.
9	Amiri, Roudsari et al.	0	Mar e rio contaminados	X	-	-	-	Não	Amb.

Artigo número	Referência	Método de análise utilizado*	Xenobiótico	Órgão				Alteração no controle	Tipo de estudo**
				Brânquia	Fígado	Rim	Outro		
	(2011)								
10	Athikesavan, Vincent et al. (2006)	0	Níquel	X	X	X	Intestino	Não	Lab.
11	Ayoola (2008)	0	Glifosato	X	X	X	Cérebro	Não	Lab.
12	Banerjee and Bhattacharya (1994)	0	Amônia	-	-	X	-	Não	Lab.
13	Barišić, Dragun et al. (2015)	0	Poluição	X	-	-	-	Não	Amb.
14	Barja-Fernández, Míguez et al. (2013)	1	2,2′,4,4′-tetrabromodiphenyl	X	X		X Intestino	Não	Amb.
15	Benli, Köksal et al. (2008)	1	Amônia	X	X	X	-	Não	Lab.
16	Camargo and Martinez (2007)	4	Ambiente natural	X	X	X	-	Não	Amb.
17	Cantanhêde, Medeiros et al. (2014)	4	Água de um parque Ecológico	X	-	-	-	Não	Amb.
18	Cengiz and Unlu (2006)	1	Deltametrin	X	-	X	-	Não	Lab.
19	Crestani, Menezes et al. (2007)	0	Herbicida	-	X	-	-	Não	Lab.
20	Domingos, Assis et al. (2009)	3	Estuário antropizado	X	X	-	-	Não	Amb.
21	El-Shebly and Heba Allah M. Gad (2011)	0	Amônia	X	-	-	-	Não	Lab.
22	Fernandes, Cardoso et al. (2007)	0	Chumbo	X	X	-	-	Não	Lab.
23	Flores-Lopes and Thomaz (2011)	4	Ambiente natural	X	-	-	-	Não	Amb.
24	Frances, Nowak et al. (2000)	2	Amônia	X	-	-	-	Sim	Lab.
25	Garcia-Santos, Monteiro et al. (2007)	0	Cádmio	X	-	-	-	Não	Lab.
26	Hued, Oberhofer et al. (2012)	3	Roundup	X	X	-	-	Não	Lab.
27	Langiano and Martinez (2008)	4	Glifosato	-	X	-	-	Não	Lab.
28	Leasea, Hansen et al. (2003)	0	Amônia	X	-	-	-	Não	Lab.
29	Leonardo, Vargas et al.	1	Vitamina C	X	-	-	-	Sim	Lab.

Artigo número	Referência	Método de análise utilizado*	Xenobiótico	Órgão				Alteração no controle	Tipo de estudo**
				Brânquia	Fígado	Rim	Outro		
	(2001)								
30	Maceda-Veiga, Monroy et al. (2013)	1	Contaminação por esgoto	-	X	-	-	Não	Amb.
31	Marchand, Dyk et al. (2009)	3	Poluição	-	X	-	-	Não	Amb.
32	Marcon, Bazzoli et al. (2015)	4	Organoclorado	-	X	-	-	Sim	Amb.
33	McHugh, Smit et al. (2011)	3	Poluição	X	X	X	-	Não	Amb.
34	Mela, Randi et al. (2007)	3	Metilmercurio	-	X	X	-	Não	Lab.
35	Miron, Moraes et al. (2008)	0	Amonia	X	-	-	-	Não	Lab.
36	Monfared, Bahrami et al. (2015)	0	Nano partículas	X	-	X	-	Não	Lab.
37	Monteiro, Rocha et al. (2008)	2	Metais	X	-	-	-	Não	Lab.
38	Mota, Henrique et al. (2015)	4	Roundup	X	-	-	-	Não	Lab.
39	Neškovic, Poleksic et al. (1996), (Ganeko 2003)	0	Glifosato	X	X	X	-	Não	Lab.
40	Pamplona, Oba et al. (2011)	0	Dipirona	-	-	X	-	Não	Lab.
41	Rajeshkumar, Sukumar et al. (2014)	0	Metal pesado	X	X	-	X Músculo	Não	Lab.
42	Rudnicki, Melo et al. (2009)	2	Azodrin®400	X	-	-	-	Não	Lab.
43	Saraiva, Costa et al. (2015)	3	Cultivo	X	X	X	-	Não	Amb.
44	Salazar-Lugo, Mata et al. (2011)	0	Paraquat em diferentes temperaturas	X	X	X	-	Não	Lab.
45	Shiogiri, Paulino et al. (2012)	4	Roundup	X	X	-	-	Não	Lab.
46	Song, Vijver et al. (2015)	0	Cobre	X	-	-	-	Não	Lab.
47	Spencer, Pollock et al. (2008)	2	Amônia	X	-	-	-	Não	Lab.
48	Troncoso, Cazenave et al. (2012)	3	Ambienta natural	X	X	-	-	Não	Amb.
49	Valon, Valbona et al. (2013)	0	Poluição	-	X	-	-	Não	Amb.
50	Viana, Frédou et al. (2013)	4	Cobre	-	X	-	-	Não	Amb.

* 0 – Nenhum índice foi utilizado, somente descrição das alterações; 1 – Mallatt (1985); 2 – Percentagem similar ao método proposto por Cardoso (2006); 3 - Bernet, Schmidt et al. (1999) e 4 - Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994).
**Amb = Animais coletados em ambiente natural. Lab = Animais expostos ao xenobiótico em condições laboratoriais.

Nesses artigos analisados foi reportada a ocorrência de 118 alterações teciduais, sendo 32 branquiais, 46 hepáticas e 40 renais (Figura 4). Muitas alterações teciduais, praticamente a metade dessas alterações (n= 54) não foram identificadas em mais de um estudo, sendo 8 nas brânquias, 21 no fígado e 25 nos rins; o que leva a duas hipóteses: 1) tais alterações são extremamente específicas, ou 2) sua identificação não é fácil, o que faz com que nem todos os observadores consigam diferenciá-las de um tecido normal.

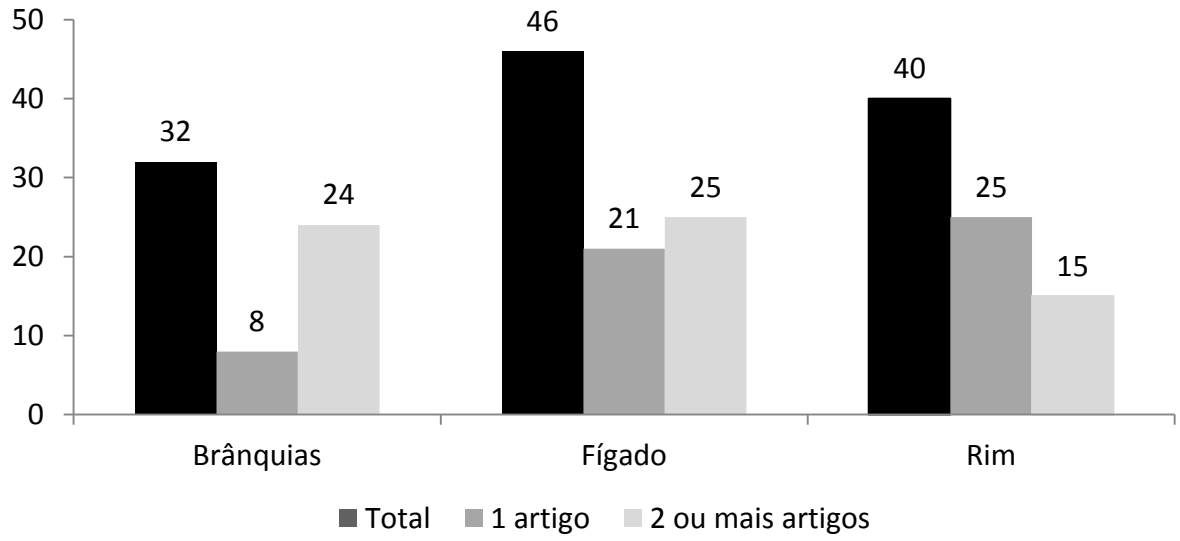


Figura 4. Ocorrência de alterações teciduais em brânquias, fígado e rim causadas por xenobióticos em peixes.

É importante ressaltar, por fim, que as demais alterações relatadas (n=64) foram observadas em mais de um estudo e não foram relacionadas a um tipo específico de agente contaminante, ou seja, não são alterações teciduais patognomônicas.

Brânquias

Funções

As brânquias atuam na fisiologia da osmorregulação e em trocas gasosas (Bernet, Schmidt et al. 1999, Monteiro, Mancera et al. 2005). São também responsáveis pela excreção de grande parte dos resíduos nitrogenados gerados a partir do catabolismo proteico (Ferguson 1989). Por outro lado, são consideradas importantes vias de absorção, bioconcentração e excreção de substâncias tóxicas, sendo um órgão bastante exposto a contaminantes (Ameur, El Megdiche et al. 2015). Segundo Barreto (2006) e Benli and Koksal (2005), as brânquias são o primeiro órgão afetado por xenobióticos presentes na água. Parte dessa vulnerabilidade deve-se ao fato delas possuírem uma extensa superfície, permanentemente em contato com o ambiente externo (Hinton and Lauren 1990), apresentando ainda uma alta taxa de perfusão, o que facilita a entrada de poluentes (Heath 1987, Wendelaar Bonga 1997) e, consequentemente, a ocorrência de alterações morfológicas (Luvizotto 1994).

Segundo Hibiya (1982) as consequências do contato direto com os poluentes podem desencadear em processos degenerativos e necróticos, transtornos de crescimento celular como hiperplasia e hipertrofia celulares, além de distúrbios circulatórios. Quando muitas lamelas branquiais são comprometidas pelas alterações teciduais a função respiratória pode diminuir. Caso os peixes estejam traumatizados pode haver a ruptura das brânquias e morte por hemorragia (Roberts 2001). Tais características fazem com que as alterações branquiais sejam consideradas importantes biomarcadores histopatológicos de peixes (Winkaler, Silva et al. 2001, Fujimoto, Cruz et al. 2008, Costa, Diniz et al. 2009, Montes, Ferrerira et al. 2010, Santos, Gomes et al. 2011).

Estudo das alterações branquiais

Lesões branquiais podem ser causadas por agentes químicos, físicos e biológicos, que induzem reações do organismo como distúrbios circulatórios, proliferativos, regressivos, inflamatórios e degenerativos (Bernet, Schmidt et al. 1999).

Os danos branquiais podem resultar em perda de equilíbrio, diminuição da eficácia respiratória, redução no desempenho natatório e mortalidade (Fairchild et al., 2005). Algumas alterações podem ocasionar ainda o aumento da distância entre os meios externo e interno, o que, por um lado, diminui o contato com o xenobiótico, mas, por outro, pode dificultar a difusão de gases respiratórios, levando o animal a um estado de hipóxia (Mallatt 1985, Fernandes and Mazon 2003).

Em um universo de 50 artigos científicos aqui avaliados, 40 (80%) avaliaram a histopatologia das brânquias. Destes, 30 foram realizados em condições controladas em laboratório. 26 estudos não relataram a ocorrência de qualquer tipo de alteração nos exemplares submetidos ao tratamento controle, como pode ser observado nos estudos realizados por Benli, Köksal et al. (2008), Barja-Fernández, Míguez et al. (2013) e Mota, Henrique et al. (2015). Em contrapartida, em 4 artigos há o relato da ocorrência de alterações tantos nos animais expostos a um determinado agente estressor, quanto nos animais do grupo controle (Frances, Nowak et al. 2000, Leonardo, Vargas et al. 2001, Albinati 2009), evidenciando a ocorrência de alterações teciduais mesmo na ausência de xenobióticos.

Estudos de monitoramento/diagnóstico ambiental, que utilizaram peixes coletados diretamente dos ambientes estudados (n=10), por sua vez, identificaram a ocorrência de uma série de lesões teciduais nos animais analisados (Camargo and Martinez 2007, Domingos, Assis et al. 2009, Flores-Lopes and Thomaz 2011,

Cantanhêde, Medeiros et al. 2014, Barišić, Dragun et al. 2015). Segundo os autores supracitados, os ambientes nos quais os peixes foram coletados apresentavam alto grau de degradação, refletindo no comprometimento da higidez destes animais e validando o uso da histopatologia como ferramenta de análise.

Agrupando-se as lesões branquiais identificadas nos 40 estudos realizados com peixes expostos a xenobióticos, experimentalmente ou em ambiente natural, chega-se a um total de 32 alterações teciduais descritas, além da presença de parasitos, que podem causar lesões, mas que não são, por si só, uma lesão. Dentre estas alterações, as quatro mais prevalentes foram: hiperplasia epitelial (n=35), fusão lamelar (n=32), aneurisma (n=27) e perda de adesão epitelial (n=28), sendo que estas foram observadas tanto em animais provenientes de experimentos em condições laboratoriais (tratamentos de exposição e controle), quanto de animais coletados em ambiente natural e não expostos a agentes estressores em laboratório (Tabela 2).

Tabela 2. Alterações histopatológicas do tecido branquial de peixes, expostos à diferentes substancias, descritas em diferentes artigos (n=40).

Alterações	**Exposição**							
	Agrotóxico (n=9)	**Metal pesado (n=7)**	**Derivados de petróleo (n=2)**	**Amônia (n=6)**	**Outros* (n=6**	**Controle (n=30)**	**Ambiente natural (n=10)**	**Total**
Acúmulo de pigmentos	0	0	0	1	1	1	0	**3**
Aneurisma	4	3	2	5	4	3	6	**27**
Atrofia epitelial	0	0	0	0	0	0	1	**1**
Aumento da distância entre os filamentos	0	0	0	1	0	1	0	**2**
Bifurcação das lamelas	0	0	0	0	1	1	1	**3**
Congestão (vasodilatação)	3	2	1	2	1	2	4	**15**
Degeneração de lamelas	0	1	0	1	0	0	1	**3**
Descamação epitelial (erosão)	1	1	0	1	1	2	0	**6**
Edema epitelial	5	3	1	3	3	2	2	**19**
Encurtamento de lamelas (em regeneração)	0	0	0	1	0	0	0	**1**
Epiteliocistose	0	1	1	0	0	1	0	**3**

Alterações	Exposição						Ambiente natural (n=10)	Total
	Agrotóxico (n=9)	Metal pesado (n=7)	Derivados de petróleo (n=2)	Amônia (n=6)	Outros* (n=6	Controle (n=30)		
Espessamento de filamentos branquiais	1	0	0	0	0	0	1	**2**
Fibrose	0	0	1	0	1	1	0	**3**
Fusão lamelar	6	5	1	6	4	4	6	**32**
Hemorragia	2	0	1	1	2	1	2	**9**
Hiperemia	0	0	0	1	2	0	1	**4**
Hiperplasia de células de muco (proliferação de células de muco)	0	3	0	0	0	0	0	**3**
Hiperplasia epitelial (proliferação celular)	9	1	2	7	4	3	9	**35**
Hipertrofia de células de cloreto	2	0	1	0	0	0	0	**3**
Hipertrofia de células epiteliais	3	2	0	5	1	3	5	**19**
Infiltração de células inflamatórias	0	0	0	0	0	0	1	**1**
Infiltração leucocitária	0	0	1	0	1	0	0	**2**
Infiltração de células epiteliais	0	0	0	0	0	1	0	**1**
Má formação lamelar	1	1	1	1	0	0	7	**11**
Necrose	3	1	1	2	0	0	3	**10**
Neoplasia	0	0	0	0	0	0	1	**1**
Perda da arquitetura celular	1	0	0	0	0	0	0	**1**
Perda de adesão epitelial	6	4	1	4	4	4	5	**28**
Perda de células epiteliais (perda de células da mucosa)	0	0	0	0	0	1	0	**1**
Perda dos cílios das células ciliadas	0	0	0	0	0	1	0	**1**
Ruptura das células pilares	1	0	1	2	0	0	4	**8**
Vacuolização	0	0	0	1	1	0	1	**3**
Total de alterações	**48**	**28**	**16**	**45**	**31**	**32**	**61**	**261**
Número médio de alterações por artigo	**5,3**	**4,0**	**8,0**	**7,5**	**5,1**	**1,0**	**6,1**	**6,5**

A hiperplasia epitelial é caracterizada pelo aumento do número de células localizadas na base das lamelas e/ou no epitélio respiratório que as reveste e ocorre em virtude de uma elevação na atividade mitótica (Thomson 1978). Segundo Mumford, Heidel et al. (2007) esta alteração pode ser induzida por um aumento funcional do órgão ou por irritação química. É originária a partir do incremento dos mecanismos de defesa do tecido agredido, permitindo o afastamento ou o bloqueio de xenobióticos que estejam irritando o tecido (Robbins and Cotran 2005). Esta

alteração, entretanto, reduz severamente as trocas gasosas no local da lesão, podendo comprometer a capacidade respiratória (Noga 2010).

A fusão lamelar, por sua vez, surge em decorrência da hiperplasia epitelial, sendo que o grau da fusão tem relação com a intensidade e a localização da hiperplasia. A fusão será parcial se a hiperplasia se restringir à base do filamento ou somente a uma porção das lamelas. Porém, se esta alteração estiver presente ao longo dos filamentos, a fusão será total (Meletti et al., 2003). A hiperplasia prejudica a passagem da água entre as lamelas, dificultando a função respiratória do órgão.

O aneurisma, por sua vez, pode surgir em decorrência de reações inflamatórias ou por dificuldades circulatórias, devido a obstruções parciais do fluxo sanguíneo, ocasionadas por fenômenos hiperplásicos. Geralmente resulta do colapso do sistema de células pilares, o que prejudica a integridade vascular. Causa intensa vasodilatação local com deslocamento do epitélio lamelar, com possibilidade de ruptura epitelial e, consequentemente, uma hemorragia (Hinton e Laurén, 1990). É considerada uma alteração tecidual grave, frequentemente irreversível e associada tanto a traumas físicos, quanto químicos. Também pode ser observada após a manipulação dos peixes ou estar associada a lesões parasitárias, resíduos metabólicos ou contaminantes químicos (Santos 2010).

A perda de adesão epitelial (ou descolamento de epitélio) é interpretada como uma reação inicial das brânquias ao estresse químico, que pode ser ocasionado por uma variedade de poluentes. Esta alteração é considerada o primeiro sinal de lesão branquial, sendo caracterizada pela elevação do epitélio de revestimento das lamelas para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue e comprometendo a função respiratória do órgão (Thophon et al., 2003).

Observou-se, a partir dos 40 artigos analisados e que envolveram estudos branquiais, que o maior número médio de alterações (8 alterações por artigo) foi observado em peixes expostos a hidrocarbonetos derivados de petróleo, seguidos pela exposição à amônia (7,5 alterações por artigo).

A amônia é o principal produto final do catabolismo proteico de peixes (Diricx, Sinha et al. 2013). Também é um composto frequentemente encontrado em efluentes industriais e agrícolas, podendo ainda ser gerada naturalmente pelo processo de decomposição da matéria orgânica (Keluskar, Nerurkar et al. 2013). Por essa diversidade de fontes, a amônia é considerada um dos principais poluentes dos sistemas aquáticos continentais (Cheng, Yang et al. 2015).

Fígado

Funções

O fígado da maioria dos peixes teleósteos é composto por dois lobos. O direito, localizado ao lado da vesícula biliar, e o lobo esquerdo, localizado próximo ao baço (Takashima and Hibiya 1995). É uma glândula anexa ao aparelho digestório, composta por parênquima celular e fibras que promovem sua sustentação. Sua superfície é revestida por uma membrana serosa e o tecido conjuntivo dessa cápsula penetra no parênquima hepático (Giulio and Hinton 2008). As células que constituem o fígado são os hepatócitos, entre os quais há células epiteliais dos ductos biliares, macrófagos (ou células de Kupffer), células sanguíneas e endotélio (Takashima and Hibiya 1995).

O fígado participa dos metabolismos proteico e lipídico, da produção e secreção de bile, no armazenamento e na produção de glicose, na síntese de proteínas plasmáticas e de colesterol, no metabolismo de hormônios e na

transformação, acúmulo e excreção de contaminantes (Heath 1995). É um órgão essencial para a desintoxicação e excreção de substâncias tóxicas em peixes, sendo o principal órgão responsável pela biotransformação de xenobióticos e, provavelmente, pela excreção de metais (Heath 1987, Hinton and Lauren 1990, Figueiredo-Fernandes, Fontaıhas-Fernandes et al. 2006).

O processo de biotransformação pode ser definido como a conversão do xenobiótico, catalisada por enzimas, em uma forma mais facilmente excretada pelo organismo (Van Der Oost R., Beyer et al. 2003). Esse processo geralmente é realizado em duas fases. Na primeira, ocorre a introdução de um grupo polar na molécula, tornando-a mais solúvel e adequada às reações que ocorrem na fase II. Na segunda fase, o composto já modificado é combinado com um substrato endógeno, para produzir um produto solúvel em água e facilmente excretado (Hodgson and Goldstein 2001) (Figura 5).

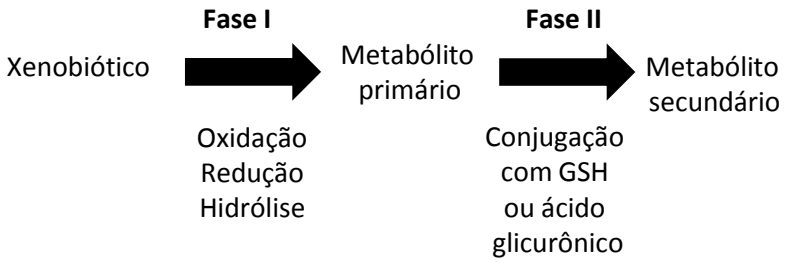


Figura 5. Fases do metabolismo hepático de xenobióticos.

Em alguns casos, os produtos intermediários ou finais deste processo podem ser até mesmo mais tóxicos que os compostos originais. Os efeitos tóxicos do xenobiótico e de seus metabólitos podem se manifestar quando o composto liga-se a macromoléculas celulares, levando à ruptura da membrana, a danos celulares ou provocando efeitos genotóxicos que, por sua vez, podem levar ao desenvolvimento ou à progressão de doenças (Van Der Oost R., Beyer et al. 2003). Desta forma, o fígado tem uma estreita relação com xenobióticos e suas lesões estão

frequentemente associadas à poluição aquática (Rajeshkumar, Sukumar et al. 2014).

Estudo das lesões hepáticas

Dos 50 artigos avaliados, 29 (58%) abordaram a histopatologia hepática e reportaram a ocorrência de 46 alterações, sendo que 20 delas foram citadas em apenas um artigo (Tabela 3). Em apenas três artigos foi reportada a ocorrência de alterações hepáticas também no tratamento controle (Akaishi, Silva De Assis et al. 2004, Crestani, Menezes et al. 2007, Marcon, Bazzoli et al. 2015).

Dentre as 46 alterações observadas, as três mais prevalentes foram: necrose (n=13), melanomacrofágos (centros melanomacrofágicos) (n=6) e hipertrofia de hepatócitos (n=6), sendo que estas foram observadas tanto em animais testados em experimentos laboratoriais, quanto de animais coletados diretamente em ambiente natural (Tabela 3).

Tabela 3. Alterações histopatológicas do tecido hepático de peixes, expostos à diferentes substancias, descritas em diferentes artigos (n=29).

Alterações	**Exposição**							
	Agrotóxico (n=10)	**Metais pesados (n=6)**	**Derivado de petróleo (n=1)**	**Amônia (n=1)**	**Outros* (n=3)**	**Controle (n=21)**	**Ambiente natural (n=8)**	**Total**
Acúmulo de lipídeos (esteatose hepática, inclusão de lipídeos, vacuolização gordurosa, degeneração gordurosa)	1	1	0	0	0	0	3	5
Alteração nuclear (degeneração nuclear, alteração no núcleo)	2	0	0	0	0	0	2	4
Alterações estruturais	0	0	0	0	0	0	1	1
Alterações granulares	0	0	0	0	0	0	1	1
Alterações citoplasmáticas	0	0	0	0	0	0	2	2
Anomalia dos hepatócitos	0	0	0	0	1	0	0	1
Atrofia celular	0	0	0	0	0	0	1	1
Atrofia nuclear	1	0	0	0	0	1	0	2
Ausência de nucléolo	1	0	0	0	0	0	0	1
Congestão .	1	0	0	0	1	0	1	3

Alterações	Exposição							
	Agrotóxico (n=10)	Metais pesados (n=6)	Derivado de petróleo (n=1)	Amônia (n=1)	Outros* (n=3)	Controle (n=21)	Ambiente natural (n=8)	Total
Congestão de sinusóide (dilatação do sinusóide e vasodilatação)	2	0	0	0	1	0	1	4
Deformação celular	1	0	0	0	0	0	0	1
Degeneração biliar	1	0	0	0	0	0	0	1
Degeneração citoplasmática	2	0	0	0	0	0	1	3
Degeneração hidrópica	1	0	0	1	1	0	0	3
Degeneração nuclear	2	0	0	0	0	0	1	3
Degeneração vascular	0	0	0	0	0	0	1	1
Degeneração granular citoplasmática	0	0	0	0	0	0	1	1
Deslocamento do núcleo para a periferia da célula (núcleo lateralizado)	1	0	0	0	0	1	1	3
Distrofia vacuolar de hepatócitos	1	0	0	0	0	0	0	1
Edema	0	0	0	0	0	0	1	1
Estagnação biliar	0	0	0	0	0	0	1	1
Exsudato	1	0	0	0	0	0	0	1
Fibrose	1	0	0	0	0	0	1	2
Forma irregular da célula	0	1	0	0	0	0	1	2
Forma irregular do núcleo	0	0	0	0	0	1	1	2
Grânulos citoplasmáticos	1	0	0	0	0	0	0	1
Grânulos citoplasmáticos eosinofílicos	0	0	0	0	0	0	1	1
Hemorragia	1	0	0	0	0	0	1	2
Hiperemia	2	0	0	0	2	0	1	5
Hipertrofia citoplasmática	1	0	0	0	0	0	0	1
Hipertrofia nuclear	2	0	0	0	1	1	1	5
Hipertrofia dos hepatócitos	2	0	0	0	1	0	3	6
Infiltração leucocitária	2	1	0	0	0	0	2	5
Infiltração de linfócitos	1	0	0	0	0	0	2	3
Melanomacrofágos (centros melanomacrofágicos)	1	1	1	0	0	0	3	6
Morfologia irregular	0	0	0	0	1	0	0	1
Necrose	6	2	1	0	0	1	3	13
Nucléolos evidentes	1	0	0	0	0	0	0	1
Núcleo picnótico (picnose)	1	0	0	0	1	0	0	2
Parasito	0	0	1	0	0	1	0	2
Perda de limite celular	0	0	1	0	0	0	0	1
Ruptura celular	0	0	0	0	1	0	0	1
Vacuolização	2	1	0	0	0	0	1	4
Vacuolização citoplasmática (vacuolização dentro dos hepatócitos)	1	1	0	0	0	0	2	4
Vacuolização nuclear	1	0	0	0	1	0	1	3
Total de alterações	**43**	**8**	**4**	**1**	**12**	**6**	**43**	**117**
Número médio de alterações por artigo	**4,3**	**3,0**	**4,0**	**1,0**	**4,0**	**0,28**	**5,3**	**4,0**

A necrose hepática é caracterizada pelo processo de morte celular ou tecidual, causada por lesões nucleares e citoplasmáticas irreversíveis, seguidas pela perda dos limites celulares e pela a reabsorção por células fagocíticas (Thomson 1978).

Centros melanomacrofágicos (CMMs), por sua vez, são agregados de macrófagos, que podem acumular grânulos de melanina, hemossiderina e lipofuscina em seu citoplasma (Agius and Roberts 2003). Autores relataram um aumento no número de CMMs em organismos submetidos a agentes agressores (Rabitto, Costa et al. 2005, Mela, Randi et al. 2007). Por este motivo, estes agregados de macrófagos são utilizados como biomarcadores de ambientes impactados (Agius and Roberts 2003).

A hipertrofia de hepatócitos, por fim, é caracterizada pelo aumento do volume destas células (Thomson 1978). Esta alteração é citada em peixes expostos ao poluente PBDEs (Barja-Fernández, Míguez et al. 2013), a herbicidas (Altinok and Grizzle 2003) e também em peixes coletados diretamente no ambiente natural (Camargo and Martinez 2007).

Animais presentes em ambiente natural tendem a apresentar uma maior quantidade de alterações quando comparados a animais expostos a xenobióticos em condições laboratoriais. Isso pode ocorrer porque em ambientes antropizados pode existir uma interação entre xenobióticos (mistura complexa de xenobióticos), que, por sua vez, chegam aos corpos hídricos por deposição atmosférica, lixiviação e/ou lançamentos diretos (propositais ou acidentais) (Duce and Liss 1991, Schnoor 1996), Domingos, Assis et al. (2009). Sendo assim, em ambiente natural não se sabe ao certo quais são os xenobióticos presentes na água, o que dificulta a

interpretação dos resultados. Em experimentos realizados em laboratório isso não ocorre visto que geralmente apenas um xenobiótico é testado por vez.

Rim

Funções

O rim de peixes teleósteos é divido em duas porções (anterior e posterior). A porção anterior é integrada ao sistema endócrino, sendo importante na resposta ao estresse (Wendelaar Bonga 1997). A posterior, assim como o intestino e as brânquias, é responsável pela excreção e pela homeostase dos fluídos corporais (Evans 1993).

Nos teleósteos dulcícolas, os glomérulos são responsáveis pela ultrafiltração do sangue e estão concentrados na porção posterior do rim. Neste local, ocorre extensa reposição de íons durante o fluxo do filtrado nos túbulos renais, produzindo o fluido que dará origem à urina (Jobling 1995, Takashima and Hibiya 1995). O rim também atua na eliminação de xenobióticos durante a formação da urina. Isso pode ocorrer por meio da filtração glomerular, por reabsorção ou por processos de secreção tubular (Jobling 1995).

Estudo de lesões renais

Segundo Thophon, Kruatrachue et al. (2003), o rim de teleósteos, por processar grande volume sanguíneo, juntamente com as brânquias, é um dos primeiros órgãos a serem afetados por contaminantes. Por isso, o rim pode ser considerado um órgão-alvo nos estudos do efeitos de poluentes para os peixes (Hinton, Baumann et al. 1992).

Entre os artigos científicos aqui avaliados (n=50), 16 (32%) utilizaram os rins como um dos órgãos destinados à histopatologia. Destes, a maioria (n=13) foi

realizada em condições laboratoriais, sendo mais comum (n=5) em estudo de exposição dos peixes a agrotóxicos. Apenas Salazar-Lugo, Mata et al. (2011) mencionaram a ocorrência de alterações nos exemplares dos tratamentos controle e somente três dos artigos analisados fizeram referência a exemplares coletados em ambiente natural (Camargo and Martinez 2007, McHugh, Smit et al. 2011, Saraiva, Costa et al. 2015).

Dentre as 40 alterações renais identificadas nos artigos, degeneração (n=7) apresentou maior prevalência (Tabela 4). Dentre as demais alterações, 25 foram citadas em apenas um artigo cada.

Tabela 4. Alterações histopatológicas do tecido renal de peixes, expostos à diferentes substancias, descritas em diferentes artigos (n=16).

Alterações	Exposição					Ambiente natural (n=3)	Total
	Agrotóxico (n=5)	Metal pesado (n=3)	Amônia (n=2)	Outros (n=3)	Controle (n=13)		
Aumento do espaço entre as células da cápsula de Bowman	2	0	0	0	0	0	2
Aumento dos glomérulos	0	0	0	0	0	1	1
Células hipertrofiadas	1	0	0	1	0	1	3
Células necróticas	2	1	0	0	0	0	3
Citoplasmólise	0	1	1	0	0	0	2
Degeneração, vacuolização	2	1	1	1	0	2	7
Degeneração das células epiteliais	1	0	0	0	0	0	1
Degeneração de glomérulo	1	0	0	0	0	0	1
Degeneração dos túbulos renais	0	1	0	0	0	0	1
Degeneração hialina	0	0	0	1	0	1	2
Degeneração vacuolar de células epiteliais dos túbulos renais	0	0	0	0	0	1	1
Destruição no alinhamento colunar dos tecidos inter-renal	0	0	1	0	0	0	1
Dilatação dos capilares glomerulares	1	0	1	0	0	2	4
Diminuição do diâmetro glomerular	0	0	0	1	0	0	1
Dilatação do lúmen tubular	0	0	0	0	0	1	1
Estreitamento do lúmen tubular	1	0	0	0	0	0	1
Fibrose	1	0	0	0	0	0	1
Glomerulonefrite	0	0	1	0	0	0	1
Glomérulos com exsudato eosinofílico	1	0	0	0	0	0	1
Glomérulo colapsado ou distorcido	1	0	0	0	0	0	1
Hemólise dos eritrócitos	0	1	0	0	0	0	1

Alterações	Exposição					Ambiente natural (n=3)	Total
	Agrotóxico (n=5)	Metal pesado (n=3)	Amônia (n=2)	Outros (n=3)	Controle (n=13)		
Hiperemia	0	0	1	0	0	1	2
Hiperplasia celular nos túbulos	0	1	0	1	0	0	2
Hipertrofia nuclear	0	1	0	0	0	1	2
Cariólise	0	1	0	1	0	0	2
Má formação glomerular	0	1	0	0	0	0	1
Melanomacrófagos (centros melanomacrofágicos)	1	1	0	0	0	1	3
Necrose dos tecidos hematopoiéticos	1	0	0	0	0	1	2
Necrose nas células glomerulares	1	0	0	0	0	0	1
Necrose nas células tubulares	1	0	0	0	0	0	1
Nefrocalcinose	0	0	0	0	0	1	1
Núcleos picnóticos	2	1	0	0	0	0	3
Oclusão do lúmen tubular	1	0	0	0	0	0	1
Perda do arranjo lobular de tecido cromafins	1	0	0	0	0	0	1
Redução do espaço entre as células da cápsula de Bowman	0	1	0	0	0	0	1
Redução do tamanho da cápsula de Bowman	0	0	1	0	0	0	1
Regeneração dos túbulos	0	0	0	0	0	1	1
Ruptura celular	0	1	0	1	0	0	2
Separação do epitélio tubular renal do tecido conjuntivo circundante	1	0	0	0	0	0	1
Sinusóide aumentado	1	0	0	0	0	0	1
Total de alterações	**24**	**13**	**7**	**7**	**0**	**15**	**66**
Número médio de alterações por artigo	**4,8**	**4,3**	**3,5**	**2,3**	**0**	**5**	**2,3**

De acordo com Thomson (1978), é comum - em um determinado grau - a presença de degenerações e de necroses nos tecidos. Segundo o autor estas alterações podem ocorrer em função do aumento das necessidades funcionais das células ou mesmo por exposição a xenobióticos.

Ao quantificar as alterações reportadas por artigo, observou-se uma grande quantidade de lesões renais em animais coletados diretamente em ambientes naturais. Da mesma forma que o comentado em relação ao tecido hepático, pode-se inferir que os ambientes nos quais os peixes foram coletados apresentavam um

maior número de xenobióticos do que os testados em condições laboratoriais, o que explicaria essa prevalência de lesões.

Métodos analíticos quantitativos empregados na histopatologia de peixes

Enquanto os métodos analíticos qualitativos apresentam dados histopatológicos de forma descritiva, sem nenhum tratamento estatístico das alterações observadas, os métodos quantitativos permitem a representação numérica dos dados obtidos e o uso de análises estatísticas para interpretação dos resultados (Dalfovo, Lana et al. 2008).

Como pode ser observado na Tabela 1 é grande o número de artigos (29 dos 50 aqui analisados, ou seja, 58%) em que os autores limitaram-se a descrever as patologias observadas ou avaliar presença e ausência de alterações, sem a aplicação de índices que as quantificassem ou descrevessem sua evolução ao longo do tempo. Alguns autores que não utilizaram índices quantitativos, ou seja, que somente descreveram as alterações observadas comentaram que foram registradas alterações histológicas no tratamento de exposição e que essas não foram identificadas no tratamento controle (Athikesavan, Vincent et al. 2006, Garcia-Santos, Monteiro et al. 2007, Pamplona, Oba et al. 2011). Mas, nesses casos, a ausência de parâmetros estatísticos pode levar a uma falsa impressão de que as diferenças obtidas entre tratamentos de exposição e os controles seriam obrigatoriamente significativas, o que só poderia ser categoricamente afirmado com a aplicação de métodos estatísticos apropriados.

Dentre as metodologias qualitativas disponíveis está a proposta por Mallatt (1985), que utiliza uma escala de valores que considera apenas o tamanho da

alteração histológica observada (Maceda-Veiga, Monroy et al. 2013, Agus, Erkmen et al. 2015). O uso deste método possibilita a verificação da prevalência de cada umas das alterações em uma determinada amostra, embora seus resultados sejam relativamente subjetivos e suscetíveis à interpretação do observador. Isso ocorre visto que as alterações são classificadas, de acordo com a extensão afetada do tecido analisado. Nesse método, as lesões são classificadas, de acordo com a extensão afetada do tecido analisado, em 1 (leve (+)), 2 (moderada (++)) e 3 (severa (+++)). A classe 1 corresponde a lesões presentes em até 25% da área analisada, a classe 2 a lesões presentes em 25-50% da área; e a classe 3 quando a lesão compromete mais de 50% da área analisada. Nove dos artigos analisados (18%) utilizaram esta metodologia (Leonardo, Vargas et al. 2001, Akaishi, Silva de Assis et al. 2004, Cengiz and Unlu 2006, Benli, Köksal et al. 2008, Albinati 2009, Al-Bairuty, Shawa et al. 2013, Barja-Fernández, Míguez et al. 2013, Maceda-Veiga, Monroy et al. 2013, Agus, Erkmen et al. 2015).

Dentre os índices quantitativos tem-se o Índice de Impacto, proposto por Cardoso (2006). Este índice, assim como a metodologia proposta por Mallatt (1985) não leva em consideração a severidade das lesões identificadas, mas apenas a sua ocorrência e prevalência. Ambas as metodologias, entretanto, podem ser usados para avaliação em diversos órgãos, como, por exemplo, brânquia, fígado, rim e pele.

O índice proposto por Cardoso (2006), quando utilizado para avaliação branquial, por exemplo, analisada as lamelas de cinco filamentos e as alterações observadas são registradas. O IIBr (Índice de Impacto Branquial), pode ser calculado individualmente para cada tipo de alteração, podendo apresentar valores variando de zero (valor mínimo, evidenciando a ausência de alterações teciduais) a 1,0 (valor máximo, evidenciando alterações em todos os filamentos analisados). O índice é

obtido por meio da divisão do número de lamelas alteradas pelo número total de lamelas analisadas. Este método permite que se calcule ainda o Índice Branquial Total de Impacto em um determinado órgão, somando-se as alterações individuais observadas nos filamentos analisados.

$$IIBR = (N1/N2)$$

Onde: N1= n° de lamelas alteradas e N2= n° de lamelas analisadas.

Nas análises de outros tecidos, como por exemplo, fígado são capturadas aleatoriamente e analisadas sob microscópio óptico, imagens de cinco campos em um corte histológico, com aumento de 400 vezes. Nesses campos são mensuradas as áreas totais analisadas e as alteradas para cada alteração diagnosticada. O índice de impacto é obtido por meio da divisão da medida da área alterada pela medida da área total analisada.

$$IIHT = (A1/A2)$$

Onde: IIHT é o índice de Impacto Hepático, A1= área alterada e A2= área total analisada.

Quatro artigos analisados (8%) (Frances, Nowak et al. 2000, Monteiro, Rocha et al. 2008, Spencer, Pollock et al. 2008, Rudnicki, Melo et al. 2009) fizeram análise dos resultados baseado em porcentagem, método muito parecido com o proposto por Cardoso (2006).

Bernet, Schmidt et al. (1999), por sua vez, propõem a utilização de quatro índices, de acordo com o objetivo da pesquisa a ser realizada. Estes índices baseiam-se na relevância patológica da alteração observada (w) e na extensão das lesões observadas (α).

A relevância patológica tem relação com a potencialidade da lesão de afetar as funções dos órgãos ou a capacidade de sobrevivência dos peixes. Neste caso, os

autores atribuem valores de 1 a 3 às lesões. Lesões tipo 1 são aquelas que possuem mínima relevância patológica, ou seja, seriam facilmente recuperadas ao final da exposição. Lesões tipo 2 seriam moderadas e auto limitantes, havendo recuperação da área afetada ao final da exposição ao agente patogênico. Já as lesões do tipo 3 apresentariam acentuada importância patológica, ou seja, são lesões geralmente irreversíveis, que ocasionariam a perda de funcionalidade total ou parcial do órgão.

Os valores atribuídos a cada uma das 108 lesões identificadas pelos autores são pré-determinados no artigo (23 para brânquias, 31 para rim, 31 para fígado e 23 para pele), não dependendo de interpretação do observador. Já a extensão da lesão, por sua vez, depende da interpretação do observador, que deve conferir escores entre 0 e 6, dependendo do grau de sua extensão no campo analisado.

Bernet, Schmidt et al. (1999) sugerem a aplicação de dois índices, quando a análise envolve a avaliação de apenas um órgão. O primeiro é o Índice do Órgão (I_{org}), que representa o grau de alterações apresentadas no órgão analisado. Este é o somatório da multiplicação do tamanho da lesão e da relevância patológica de todos os cortes analisados. Já o segundo índice, chamado de Índice de Reação ($I_{org\ rp}$), visa avaliar a gravidade das alterações identificadas. O $I_{org\ rp}$ é composto pelo somatório do produto da multiplicação do tamanho da lesão pela relevância patológica, considerando o padrão de reação da lesão identificada.

$$\mathrm{Iorg} = \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha \text{ or rp alt x } w \text{ or rp alt})$$

$$\mathrm{Iorg\ rp} = \sum_{alt} (\alpha \text{ or rp alt x } w \text{ or rp alt})$$

Onde: org=orgão, alt=alteração, rp=padrão de reação, α=tamanho da lesão, e w=relevância patológica da alteração.

Os outros dois índices são utilizados quando vários órgãos de um peixe são examinados. O Índice Total representa uma medida do estado geral de saúde com base nas lesões histológicas. Visto que este índice é calculado da mesma forma para todos os peixes, uma comparação entre diferentes peixes é possível. Já o Índice de Reação Total representa a qualidade das lesões histológicas em todos os órgãos examinados. Este é caracterizado pela a soma dos índices de reação correspondentes de todos os órgãos examinados de um peixe. Usando este índice é possível realizar a comparação entre diferentes animais.

$$\text{Índice Total} = \sum_{org} \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha_{or\ rp\ alt} \times w_{or\ rp\ alt})$$

$$\text{Índice de reação total} = \sum_{org} \sum_{alt} (\alpha_{or\ rp\ alt} \times w_{or\ rp\ alt})$$

Onde: org=orgão, alt=alteração, rp=padrão de reação, α=tamanho da lesão, e w=relevância patológica da alteração.

Este método de análise foi utilizado em oito artigos (Mela, Randi et al. 2007, Domingos, Assis et al. 2009, Marchand, Dyk et al. 2009, McHugh, Smit et al. 2011, Hued, Oberhofer et al. 2012, Troncoso, Cazenave et al. 2012, Agamy 2013, Saraiva, Costa et al. 2015), entretanto nenhum deles realizou a comparação entre os órgãos. Nos artigos publicados por Domingos, Assis et al. (2009), Jacob, Nandini et al. (2012), Hued, Oberhofer et al. (2012) e Agamy (2013), Barišić, Dragun et al. (2015), os autores relatam a utilização dos índices de Bernet, Schmidt et al. (1999), porém, os autores não apresentam resultados quantitativos das análises por eles realizadas e, obviamente, não apresentam a variação desses índices ao longo dos experimentos. Ou seja, apesar dos autores terem supostamente utilizado índices quantitativos, os valores numéricos não foram apresentados nos respectivos artigos,

o que não permite, de fato, afirmar que os resultados foram analisados quantitativamente.

Outro método quantitativo de análise de alterações histológicas foi descrito por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994). Nesse método, as alterações branquiais são classificadas em três estágios, de acordo com o comprometimento das funções do órgão analisado. Estágio I refere-se a alterações que não comprometem o funcionamento do órgão. As de estágio II prejudicam o funcionamento normal do órgão e as de estágio III são muito severas e irreversíveis. No artigo os autores apresentam uma tabela identificando as alterações e também o estágio em que elas se encontravam. Nesta são reportados cinco grupos de alterações (hipertrofia e hiperplasia do epitélio branquial, alterações nas células de muco ou das células de cloreto, alterações circulatórias, presença de parasitos nas brânquias e estágios terminais) os quais englobam 26 alterações. Estes autores, entretanto, classificam parasitos presentes nas brânquias como uma alteração. Contudo, o parasito, apesar de potencialmente causar lesões, não pode ser classificado como uma lesão. As alterações restantes identificadas (n=25) são classificadas da seguinte forma: 19 pertencem ao estágio 1; quatro ao estágio 2 e apenas duas alterações ao estágio 3. Segundo os autores essa classificação foi baseada em peixes coletados em ambiente natural. De acordo com os autores, os animais possuem normalmente alterações, sem que haja necessidade de estes serem expostos a xenobiontes. Sendo assim, alterações comumente encontradas nas brânquias de peixes foram classificadas na classe 1, ou seja, a grande maioria das alterações citadas.

A partir desta classificação é realizado o cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), que é calculado para cada animal utilizando a fórmula:

$$IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$$

Onde: I, II e III correspondentes ao número de alterações de estádio I, II e III.

Os autores consideram, portanto o número de vezes que cada alteração aparece e os multiplicam por 10^0, 10^1, e 10^2 segundo o estádio da alteração. Sendo assim as alterações de estádio 1 são multiplicadas por 10^0 e as de estádio 3 por $10^{2.}$ Desta forma seriam necessárias 100 alterações de estádio 1 ou apenas 1 de estádio 3 para que o dano causado ao tecido fosse considerado irreversível. Peixes que apresentem alterações de estágio 3 (fibrose ou necrose), portanto, são classificados como o nível mais alto de alterações, o que apresenta danos irreparáveis às brânquias. Estes autores, por sua vez, não fazem uso do tamanho da alteração; por este motivo, todas as alterações observadas, desde que estejam no mesmo estágio, independente de tamanho, recebem o mesmo valor.

O valor médio de IAH é classificado em cinco categorias de danos, sendo que de 0-10 considera-se o funcionamento normal do tecido; 11-20 o dano é considerado de leve a moderado; 21-50 o dano é moderado a severo; 51-100 o dano passa a ser considerado severo e maior que 100 considera-se que o dano causado ao tecido é irreversível.

Dentre os estudos analisados, nove artigos utilizaram essa metodologia para análise das alterações teciduais. Destes, entretanto, apenas três abordam apenas a alterações teciduais branquiais (Flores-Lopes and Thomaz 2011, Cantanhêde, Medeiros et al. 2014, Mota, Henrique et al. 2015). Os demais abordam além das brânquias, o fígado (Shiogiri, Paulino et al. 2012), o fígado e o rim (Camargo and Martinez 2007) e a pele (Abalaka , Fatihu et al. 2015). Os outros três estudos abordam apenas histologia de fígado (Langiano and Martinez 2008, Viana, Frédou et

al. 2013, Marcon, Bazzoli et al. 2015). Como este método analítico foi desenvolvido especificamente para análises branquiais, poucos (apenas três) estudos utilizaram o índice como foi proposto. Os demais autores (n=6) promoveram modificações no índice para poder aplicá-lo a outros órgãos.

As análises aqui realizadas mostram que a histopatologia pode ser uma importante ferramenta de análise dos efeitos decorrentes da exposição de peixes a contaminantes. Contudo, a robustez, a confiabilidade e a reprodutibilidade dos resultados obtidos em estudos que utilizam essa ferramenta podem ser diretamente afetados por uma grande variedade de fatores, relacionados desde ao delineamento experimental, passando pelas características biológicas das espécies estudadas, pela escolha do protocolo analítico dos cortes histológicos e até dos métodos de análise (qualitativos ou quantitativos) empregados para avaliação dos próprios resultados obtidos. Aliás, em relação aos métodos de análise, fica claro que os métodos quantitativos podem ser bem mais elucidativos e conclusivos que apenas a simples descrição das alterações observadas. Entretanto, há ainda a necessidade de desenvolvimento de métodos quantitativos que sejam menos subjetivos, que combinem, de forma mais padronizada, tanto o tamanho, quanto a severidade e a reversibilidade das lesões observadas. O uso de índices quantitativos seria, na maioria dos casos, mais elucidativo e conclusivo que a simples descrição de alterações teciduais observadas. Mas, constata-se que também há muito o que se avançar em relação a isso. Os índices atualmente disponíveis ainda carregam em si uma dose muito grande de subjetividade.

Metodologias para utilização da histopatologia por microscopia de luz em condições laboratoriais

A histopatologia por microscopia de luz tem sido utilizada como ferramenta de avaliação de exposição de curta duração (entre 24 e 96h) (EPA (2002), de média duração (7 dias) (Monteiro, Rocha et al. 2008) e de longa duração (até 70 dias) (Mela, Randi et al. 2007). O fato é que as lesões teciduais geralmente necessitam de um tempo mínimo de exposição ao xenobiótico para que sejam induzidas e identificáveis. Este tempo de exposição, por sua vez, pode variar de acordo com o xenobiótico investigado e as concentrações empregadas. Por isso, a definição de um período adequado de exposição torna-se essencial para obtenção de resultados robustos.

Experimentos de exposição aguda geralmente envolvem concentrações elevadas de xenobióticos e utilizam metodologia proposta pela EPA (2002). Nesse caso, o essencial é a identificação e a coleta dos indivíduos recém mortos, pois, do contrário, a rápida autólise dos tecidos pode inviabilizar as análises.

Já em experimento de exposição subcrônica e crônica não existe um método padrão a ser empregado, ficando a cargo do pesquisador propor a metodologia mais adequada para alcançar o objetivo desejado. Porém, essa liberdade na escolha da metodologia dificulta a comparação de resultados entre diferentes estudos.

Outra questão a ser considerada é o período de aclimatação às condições laboratoriais a que os animais são submetidos antes dos experimentos. Este período varia na literatura, mas geralmente não é inferior a 48 horas. Entretanto, de acordo com características biológicas da espécie estudada, esse período pode se estender por 15 (Hued, Oberhofer et al. 2012, Agus, Erkmen et al. 2015), 21 (Abalaka , Fatihu et al. 2015) ou até chegando a alcançar 30 dias de aclimatação (Mela, Randi et al.

2007). Obviamente que essas diferenças são mais um fator complicador quando da comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos.

As unidades experimentais (aquários, tanques, etc.), por sua vez, podem ainda apresentar volumes variados, o que pode influenciar na densidade e na biomassa de peixes utilizada experimentalmente. Miron, Moraes et al. (2008) utilizaram 3 g de peixe/L de água, Mota, Henrique et al. (2015) utilizaram 17 g/L, enquanto Salazar-Lugo, Mata et al. (2011) utilizaram 34 g/L. Alguns autores utilizam um animal por unidade experimental (Mela, Randi et al. 2007, Mota, Henrique et al. 2015), enquanto que outros utilizam vários animais no mesmo ambiente (Salazar-Lugo, Mata et al. 2011, Hued, Oberhofer et al. 2012). É preciso, portanto, garantir que a densidade utilizada não seja, por si só, um fator de indução ao desenvolvimento de alterações teciduais, o que poderia mascarar os resultados obtidos, especialmente nos casos em que métodos quantitativos de análise não são empregados.

Com relação a espécie a ser testada existem alguns fatores que devem ser sempre levados em conta, como por exemplo, a fisiologia, o comportamento e as características físicas e químicas do ambiente de origem (temperatura e pH da água, por exemplo). Muitas vezes estes dados não estão disponíveis para a espécie que será utilizada. Nestes casos, sugere-se a realização de experimentos pilotos para se gerar informações sobre os efeitos dessas variáveis, de modo a garantir a confiabilidade dos resultados.

Outro problema em relação à comparação de resultados histopatológicos diz respeito às diferenças na nomenclatura adotadas para descrever uma mesma lesão. Quando analisada a literatura, fica clara a dificuldade de padronização dos termos utilizados para descrever determinadas alterações teciduais. Por exemplo, hiperplasia epitelial e proliferação de células epiteliais são sinônimos. Entretanto,

alguns autores mencionam ter encontrado ambas alterações nos peixes expostos a um determinado agente.

A histopatologia por microscopia de luz também pode ser bastante suscetível a interferências analíticas e a confusão entre artefatos e patogenias. Por exemplo, foi observado em figuras publicadas em alguns trabalhos que as lamelas branquiais estavam dobradas no momento do corte, o que pode ter induzido os autores a descrever ali uma alteração, quando o que se constatava era apenas um artefato.

As técnicas histopatológicas são variadas e numerosas. Além disso, muitos autores propõem modificações e adaptações, de forma a adequá-las aos objetivos específicos de suas pesquisas. Essa “plasticidade” metodológica, por sua vez, pode também dificultar a comparação entre resultados obtidos por diferentes autores.

Referências

Abalaka , S. E., M. Y. Fatihu, N. D. G. Ibrahim and S. F. Ambali (2015). "Gills and skin histopathological evaluation in African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* exposed to ethanol extract of *Adenium obesum* stem bark." Egyptian Journal of Aquatic Research: 1-9.

Abdel-Warith, A. A., E. M. Younis, N. A. Al-Asgah and O. M. Wahbi (2011). "Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." Scientific Research and Essays **6**(17): 3760-3769.

Adams, S. M., K. L. Shepard, M. S. Greeley-Jr, B. D. Jimenez, M. G. Ryon, l. R. Shugart and J. F. Mccarthy (1989). "The use of biondicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. ." Marine Environmental Research **28**(4): 459-464.

Agamy, E. (2013). "Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study." Marine Environmental Research **86**: 46-55.

Agius, C. and R. J. Roberts (2003). "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." Journal of Fish Diseases **26**: 499-509.

Agus, H. H., B. Erkmen, S. Sumer, A. S. Dinc¸el and F. Erkoc (2015). "Impact of DBP on histology and expression of HSP 70 in gill and liver tissue of *Cyprinus carpio*." Molecular biology reports **42**: 1409-1417.

Akaishi, F. M., H. C. Silva De Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eirasstofella, S. D. ST-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira-Ribeiro (2004). "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. ." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**: 244-253.

Akaishi, F. M., H. C. Silva de Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eirasstofella, S. D. St-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira Ribeiro (2004). "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**(2): 244-253.

Akhavana, S. R., B. Falahatkara, M. H. T. Gilanib and P. M. Lokman (2015). "Effects of estradiol-17β implantation on ovarian growth, sex steroid levels and vitellogenin proxies in previtellogenic sturgeon *Huso huso*." Animal Reproduction Science **157**: 1-10.

Al-Bairuty, G. A., B. J. Shawa, R. D. Handya and T. B. Henrya (2013). "Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquatic Toxicology **126**: 104- 115.

Albinati, A. C. L. (2009). "Histological biomarkers - chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*)." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. **61**(3): 621-627.

Altinok, I. and E. Capkin (2007). "Histopathology of Rainbow Trout Exposed to Sublethal Concentrations of Methiocarb or Endosulfan." Toxicology pathology **35**: 405-410.

Altinok, I. and J. M. Grizzle (2003). "Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish." World Aquac. Soc **34**(1): 113-117.

Ameur, W. B., Y. El Megdiche, J. Lapuente, B. Barhoumi, S. Trabelsi, S. Ennaceur, L. Camps, J. Serret, D. Ramos-López, J. Gonzalez-Linare, M. H. Driss and M. Borràs (2015). "Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia " Chemosphere **135**: 67-74.

Amiri, S., H. V. Roudsari and R. Kazemi (2011). "Histopathological studies on gill tissue of caspian Vimba (*Vimba vimba persa*) from Caspian Sea And Sefidrud River, Iran." International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences.

Arya, A. and G. T. Sharma (2015). "Combined effects of cadmium and mecury on some biochemical and histochemical changes in liver, kidney and gills of *Channa punctatus (*bloch)." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **7**(8): 117-120.

Athikesavan, S., S. Vincent, T. Ambrose and B. Velmurugan (2006). "Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes)." Journal of Environmental Biology **27**(2): 391-395.

Ayoola, S. O. (2008). "Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile." African Journal of Agricultural Research **3**(12): 825-834.

Baldisserotto, B. (2013). Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. Santa Maria.

Banerjee, S. and S. Bhattacharya (1994). "Histopathology of kidney of *Channa punctatus e*xposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury, and ammonia." Ecotoxicoligal and environmental safety **29**: 265-275.

Barišić, J., Z. Dragun, S. Ramani, V. F. Marijić, N. Krasnići, R. Čož-Rakovac, V. Kostov, K. Rebok and M. Jordanova (2015). "Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (Squalius vardarensis Karaman)as an indicator of river pollution." Ecotoxicology and Environmental Safety **118**: 158-166.

Barja-Fernández, S., J. M. Míguez and R. Álvarez-Otero (2013). "Histopathological effects of 2,2′,4,4′-tetrabromodiphenylether (BDE-47)in the gills,intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*)." Ecotoxicology and evironmental safety **95**: 60-68.

Barreto, T. R. (2006). Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®). mestre, Universidade Federal de São Carlos.

Benli, A. A. K. and G. Koksal (2005). "The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Larvae and Fingerlings." Turkish Journal of Veterinary and Animal Science **29**: 339-344.

Benli, A. C. K., G. Köksal and A. Özkul (2008). "Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticu*s L.): Effects on gill, liver and kidney histology." Chemosphere **72**: 1355-1358.

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic poluttion." Journal of fish disease **22**: 25-34.

Bervoets, L., D. Knapen, M. Jonge, K. V. Campenhout and R. Blus (2013). "Differential Hepatic Metal and Metallothionein Levels in Three Feral Fish Species along a Metal Pollution Gradient " Plos one **8**(3).

Camargo, M. M. P. and C. B. R. Martinez (2007). "Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream." Neotropical Ichthyology, **5**(3): 327-336.

Cantanhêde, S. M., A. M. Medeiros, F. S. Ferreira, J. R. C. Ferreira, L. M. C. Alves, M. V. J. Cutrim and D. M. S. Santos (2014). "Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís - MA." Arq. Bras. Med. Vet. Zootec **66**(2): 593-601,.

Cardoso, M. F. (2006). Effects of seismic with bottom cable on reef fish master's degree - http://livros01.livrosgratis.com.br/cp011737.pdf, Federan University of Paraná.

Carneiro, P. C. F., S. M. Cirio and M. Schorer (2006). "Pathological study of silver catfish fingerlings experimentally infected *Ichthyophtirius multifiliis* and subjected to conventional treatments." Archives of Veterinary Sciences **11**: 33-38.

Cengiz, E. I. and E. Unlu (2006). "Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin." Environmental Toxicology and Pharmacology **22**: 200–204.

Ceyhun, S. B., S. M., D. Ekinci, O. ERDOĞAN, A. ÇiltasŞ and E. M. Kocaman (2010). "Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout." Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. **152**: 215-223.

Cheng, C.-H., F.-F. Yang, R.-Z. Ling, S.-A. Liao, Y.-T. Miao, C.-X. Ye and A.-L. Wang (2015). "Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (Takifugu obscurus)." Aquatic Toxicology **164**(0): 61-71.

Costa, P. M., M. S. Diniz, S. Caeiro, J. Lobo, M. Martins, A. M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T. A. Delvassa and E. Costa (2009). "Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach." Aquatic Toxicology **92**: 202–212.

Crestani, M., C. Menezes, G. Glusczak, D. S. Miron, R. Spanevello, A. Silveira, F. F. Gonc¸alves, R. Zanella and V. L. Loro (2007). "Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern." Chemosphere **67**: 2305-2311.

Dalfovo, M. S., R. A. Lana and A. Silveira (2008). "Métodos quantitativos e qualitativos: um resgate teórico. ." Revista Interdisciplinar Científica Aplicada **2**(4): 01-13.

Dallinger, R. and P. S. Raimbow (2003). Ecotoxicology of metals in invertebrates. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Special Publication Series.

Dalvi, R. S., A. K. Pal, L. R. Tiwari and K. Barua (2012). "Influence of acclimation temperature on the induction of heat-shock protein 70 in the catfish *Horabagrus brachysoma* (Gunther)." Fish Physiology and Biochemistry **38**: 919–927.

Dias, D. C., F. C. Maiorino, M. J. T. Ranzani-Paiva, N. M. Ishikawa, j. V. Lombardi, j. R. Ferreira, F. M. França and C. M. Ferreira (2007). "Avaliação histopatológica do baço, coração e encéfalo de tilápia *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) exposta ao cloreto de mercúrio. ." Boletim do Instituto de Pesca **33**(2): 213-220.

Diricx, M., A. K. Sinha, H. J. Liew, N. Mauro, R. Blust and G. De Boeck (2013). "Compensatory responses in common carp (Cyprinus carpio) under ammonia exposure: Additional effects of feeding and exercise." Aquatic Toxicology **142–143**(0): 123-137.

Domingos, F. X. V., H. C. S. Assis, M. D. Silva, R. C. Damian, A. I. M. Almeida, C. M. M., M. A. F. Randi and C. A. O. Ribeiro (2009). "Anthropic impact evaluation of two brazilian estuaries trough biomarkers in fish." journal of brazilian society of ecotoxicology **4**(1-3): 21-30.

Duce, R. A. and P. S. Liss (1991). "The atmospheric input of trace species to the world ocean." Global Biogeochemical Cycles **5**: 193-259.

El-Shebly, A. A. and H. A. M. Heba Allah M. Gad (2011). "Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Journal of Microbiology and Biotechnology Research **1**(4): 183-197.

EPA (2002). United States of Environmental Protection Agency. Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving eaters to freshwater and marine organisms. Washington, EUA.

Evans, D. H. (1993). The Physiology of Fish.

Evans, D. H., P. M. Piermarini and K. P. Choe (2005). "The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste." Physiological Reviews **85**(0): 97-177.

Evans, J. J., D. J. Pasnik, M. Yildimirim-Aksoy, C. Lim and P. H. Klesius (2010). "Histologic changes in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid." Aquaculture nutrition **16**(4): 385-391.

Fanta, E., F. S. Rios, S. Romão, A. C. C. Vianna and S. Freiberger (2003). "Histopathology of fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food." Ecotoxicology and Environmental Safety **54**(2): 119-130.

Ferguson, H. W. (1989). Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in deseases of teleosts.

Fernandes, A. F., J. V. F. Cardoso, S. G. Santos, S. M. Monteiro, J. Carrola, P. Matos and A. F. Fernandes (2007). "Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus,* exposed to waterborne copper." Pesquisa veterinária brasileira **27**(3): 103-109.

Fernandes, M. N. and A. F. Mazon (2003). "Environmental pollution and gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). ." Fish adaptations. USA: Science Publishers.: 203 - 231.

Fernandes Neto, M. L. and P. N. Sarcinelli (2009). "Pesticides in drinking water: a risk assessment approach and contribution to the Brazilian legislation updating process." Revista engenharia sanitária **14**(1): 69-78.

Ferraz de lima, C. L. B., N. S. Reis and P. S. Ceccarelli (1991). "Histological characterization of ichthyophthiriasis in pacu, Piractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae)." Boletim Técnico CEPTA **4**(8).

Figueiredo-Fernandes, A., A. Fontaıhas-Fernandes, E. Rocha and M. A. Reis-Henriques (2006). "Effects of gender and temperature on hepatic EROD activity, liver and gonadal histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. ." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **51**: 626-632.

Flores-Lopes, F. and A. T. Thomaz (2011). "Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring." brazilian journal of biology **71**(1): 179-188.

Frances, J., B. F. Nowak and G. L. Allan (2000). "Effects of ammonia on juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*." Aquaculture **183**: 95-103.

Fujimoto, R. Y., C. Cruz and F. R. Moraes (2008). "Analysis of effluent and histology of the skin, liver and kidney pacu (*Piaractus mesopotamicus*) supplemented with trivalent chromium." Boletim do Instituto da Pesca **34**(1): 117-124.

Ganeko, L. N. (2003). Análise dos ovos de piracanjuba, Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1849) durante a fertilziação e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida. mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP.

Garcia-Santos, S., S. M. Monteiro, J. Carrola and A. Fontainhas-Fernandes (2007). "Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. **59**(2): 376-381.

Giari, L., B. S. Dezfuli, M. Lanzoni and G. Castaldelli (2012). "The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River." Ecotoxicology and Environmental Safety **77**: 18-27.

Giguère, A., P. G. C. Campbell, L. Hare and C. Cossu-Leguille (2005). "Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **62**(3): 563-577.

Giulio, R. T. and D. E. Hinton (2008). "The toxicology of fishes. CRC Press. Taylor and Francis Group."

Handy, R. D. and W. S. Penrice (1993). "The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout,

Oncorhynchus mykiss." Comparative Biochemistry and Physiology **106C**(3): 111-124.

Heath, A. G. (1987). Water Pollution and Fish Physiology. Florida -USA.

Heath, A. G. (1995). Water Pollution and Fish Physiology. Flórida.

Hinton, D. E., P. C. Baumann, G. R. Gardner, W. E. Hawkins, J. D. Hendricks, R. A. Murchelano and M. S. Okihiro (1992). Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.

Hinton, D. E. and D. J. Lauren (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential bio-markers of exposure. In: McCarthy, J. F.. Shugart, L. R. (eds.) Biomarkers of environmental contamination.

Hodgson, E. and J. A. Goldstein (2001). Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics.n: HODGSON, E. & SMART, R.C. (eds) Introduction to biochemical toxicology. . New York, Wiley-Intercience.

Hued, A. C., S. Oberhofer and M. A. Bistoni (2012). "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 **62**: 107-117.

Jacob, J., N. J. Nandini and P. Natarajan (2012). "Histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in *Mystus gulio* (Hamilton)." Journal of Recent Trends Bioscience **2**: 10-17.

Jahanbakhshi, A. and A. Hedayati (2013). "Gill histopathological changes in Great sturgeon after exposure to crude and water soluble fraction of diesel oil." Comparative Clinical Pathology **22**: 1083–1086.

Jobling, M. (1995). Osmotic and ionic regulation water and salt balance.

Kakkar, P., R. Saxena, N. Rathee and M. Joshi (2011). "Water soluble fraction of diesel fuel induced histopathological alterations in the liver of *Channa punctatus*." Toxicology International **18**(1): 14-17.

Keluskar, R., A. Nerurkar and A. Desai (2013). "Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry." Bioresource Technology **130**(0): 390-397.

Kennish, M. J. (1991). "Anthropogenic impacts on estuaries. Em: KENNISH, M.J. (ed). Ecology of Estuaries. Vol. 2. Biological Aspects CRC Press, Boca Raton:."

Khanna, D. R., P. Sarka, A. Gautam and R. Bhutiani (2007). "Fish scales as bio-indicator of water quality of River Ganga." Environmental Monitoring and Assessment **134**(1-3): 153-160.

Kumar, A., V. P. Kesari and P. K. Khan (2013). "Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment." Biometals **26**(2): 337-346.

Lall, S. P. (2002). The Minerals. In: HALVER, John E.; HARDY, Ronald W. Fish Nutrition, Washingtown: Academic Press.

Langiano, V. C. and C. R. B. Martinez (2008). "Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus.*" Comparative Biochemistry and Physiology, Part C(147): 222-231.

Leasea, H. M., J. A. Hansen, H. L. Bergman and J. S. Meyerc (2003). "Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology **134**: 491-500.

Leonardo, J. M. L. O., L. Vargas, R. P. Ribeiro, H. L. M. Moreira, M. R. M. Natali, T. Volski and F. Cavichiolo (2001). "Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C." Acta Scientiarum **23**(4): 863-870.

Li, Z. H., J. Veliseka, V. Zlabeka, R. Grabic, J. Machova, J. Kolarova, P. Li and T. Randak (2011). "Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses." Journal of Hazardous Materials **185**: 870–880.

Lim, C., P. H. Klesius, M. H. LI and E. H. Robinson (2000). "Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge." Aquaculture **185**: 313-327.

Luvizotto, M. F. (1994). Efeitos de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Nototheniops nudifrons* (Lonberg,1906). Dissertação, Universidade Federal do Paraná.

Maceda-Veiga, A., M. Monroy, E. Navarro, G. Viscor and A. Sosto (2013). "Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river." Science of the Total Environment **449**: 9-19.

Machado, M. R. (1999). "Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade das águas." UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde **1**(1): 63-76.

Mallatt, J. (1985). "Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. ." Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences **42**: 630-648.

Marchand, M. J., J. C. Dyk, G. M. Pieterse, I. E. J. Barnhoorn and M. S. Bornman (2009). "Histopathological alterations in the liver of the Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in south Africa." Environmental Toxicology **24**: 133-147.

Marcon, L., N. Bazzoli, A. H. Mounteer and L. A. Benjamin (2015). "Histological and histometric evaluation of the liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae), exposed to different concentrations of an organochlorine insecticide." The Anatomical Record **298**: 1754-1764.

McHugh, K. J., N. J. Smit, J. H. J. Van Vuren, J. C. Van Dyk, L. Bervoets, A. Covaci and V. Wepener (2011). "A histology-based fish health assessment of the tigerfish, *Hydrocynus vittatus* from a DDT-affected area." Physics and Chemistry of the Earth **36** 895-904.

Mela, M., M. A. Randi, D. F. Ventura, C. E. Carvalho, E. Pelletier and C. A. O. Ribeiro (2007). "Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*." Ecotoxicoligal and environmental safety **68**: 426–435.

Miron, D. S., B. Moraes, B. A. G., M. Crestani, R. Spanevello, V. Loro and B. Baldisserotto (2008). "Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae)." Aquaculture **277**: 192-196.

Monfared, A. L., A. M. Bahrami, E. Hosseini, S. Soltani and M. Shaddel (2015). "Effects of Nano-particles on Histo-pathological changes of the fish." Journal of Environmental Health Science & Engineering: 13:62.

Monteiro, S. M., J. M. Mancera, A. Fontaınhas-Fernandes and M. Sousa (2005). "Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. ." Comparative biochemical and physiology **141**: 375-383.

Monteiro, S. M., E. Rocha, A. Fontainhas-FernandesS and M. Sousa (2008). "Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure." Journal of Fish Biology **73**: 1376-1392.

Montes, C. S., M. A. P. Ferrerira, S. S. D. Santos, E. I. C. F. Von Ledebur and R. Rocha (2010). "Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará state, Brazil." Acta Scientiarum Biological Sciences **32**(1): 93-99.

Moron, S. E., V. L. P. Polez, R. F. Artoni, J. L. C. Ribas and H. K. Takahashi (2006). "Estudo de alterações na concentração dos íons plasmáticos e da indução de micronúcleos em *Piaractus mesopotamicus* exposto ao herbicida atrazina." Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology **1**: 27-30.

Mota, S. B., H. S. Henrique, R. M. Duarte, A. L. Val and V. M. F. A. Val (2015). "Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*." Chemosphere **135**: 53-60.

Mourente, G., J. E. Good, K. D. Thompson and J. G. Bell (2007). "Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) " British Journal of Nutrition **98**: 770-777.

Mumford, S., J. Heidel, C. Smith, J. Morrison, B. MacConnell and V. Blazer (2007) "Fish histology and histopathology ", 357.

Naigaga, I., H. Kaiser, W. J. Muller, L. Ojok, D. Mbabazi, G. Magezi and E. Muhumuzae (2011). "Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria wetlands, Uganda." Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C **36**(14-15): 918-928.

Neškovic, N. K., V. Poleksic, I. Elezovic, V. Karan and M. Budimir (1996). "Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. ." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **56**: 295-302.

Noga, E. J. (2010). Fish disease: diagnosis and treatment, 2 ed.

Nogueira, D. J., S. C. Castro and O. R. Sá (2008). "Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (LACÈPÉDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental." Ciência et Praxis **1**(1): 2008.

Ohta, I. and A. Ebisawa (2015). "Reproductive biology and spawning aggregation fishing of the white-streaked grouper, *Epinephelus ongus*, associated with seasonal and lunar cycles." Environmental biology of fishes **98**: 1555-1570.

Pamplona, J. H., E. T. Oba, T. A. Silva, L. P. Ramos, W. A. Ramsdorf, M. M. Cestaric, C. A. Oliveira Ribeiro, A. R. Zampronio and H. C. S. Assis (2011). "Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*." 74 **3**.

Poleksic, V. and V. Mitrovic-Tutundzic (1994). Fish gills as a monitor of sublethalc and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Oxford, Fishing News Books.

Polettaa, G. L., A. Larriera, E. Kleinsorge and M. D. Mudry (2009). "Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **672**(2): 95-102.

Rabitto, I. S., J. R. M. A. Costa, H. C. S. Assis, E. Pelletie, F. M. Akaishi, A. Anjos, M. A. F. Randi and C. A. O. Ribeiro (2005). "Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus:* histopathological and biochemical findings." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**: 147-156.

Rajeshkumar, S., S. Sukumar and N. Munuswamy (2014). "Biomarkers of selected heavy metal toxicity and histology of *Chanos chanos* from Kaattuppalli Island, Chennai, southeast coast of India." Environmental Earth Science **72**: 207-219.

Rangel, C. F., A. C. S. Rosa and P. N. Sarcinelli (2011). "Use of pesticides and their implications for occupational exposure and environmental contamination." Cadernos Saúde Coletiva **19** (4): 435-443.

Robbins, S. and R. S. Cotran (2005). Patologia - Bases Patológicas das Doenças. In: Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. .

Rudnicki, C. A. M., G. C. Melo, L. Donatti, H. G. Kawall and E. Fanta (2009). "Gills of juvenile fish *Piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sub-lethal contamination with the organophosphorus Azodrin®400." Brazilian archives of biology and technology **52**: 1431-1441.

Salazar-Lugo, R., C. Mata, A. Oliveros, L. M. Rojas, M. Lemus and E. Rojas-Villarroel (2011). "Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures." Environmental Toxicology and Pharmacology **31**: 490-495.

Sampaio, F. G., C. L. Boijink , L. R. B. Santos, E. T. Oba, A. L. Kalinin and F. T. Rantin (2010). "The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)." Ecotoxicology **19**: 963–976.

Santos, D. M. S. (2010). Water quality and histopathology of organs from fish farms in the municipality of Itapecuru Mirim, Maranhão. Doctorate in Veterinary Medicine http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/d/127.pdf, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences.

Santos, T. C. A., V. Gomes, M. J. A. C. R. Passos, A. J. S. Rocha, R. B. Salaroli and P. V. Ngan (2011). "Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene." Pan-American Journal of Aquatic Sciences **6**(2): 109-120.

Saraiva, A., J. Costa, J. Serrão, C. Cruz and J. C. Eiras (2015). "A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.)." Aquaculture **448**: 375-381.

Saravanan, M., J. Y. Kim, H. N. Kim, S. B. Kim, D. H. Ko and J. H. Hur (2015). "Ecotoxicological impacts of isoprothiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a multi-biomarker assessment " Journal of Applied Aquaculture **58**(4): 491–499.

Schnoor, J. L. (1996). Environmental modeling: fate and transport of pollutants in water, air, and soil. Department of Civil and Environmental Engineering. Iowa City, USA., University of Iowa.

Sens, D. R. (2009). Efeitos do triclorfom no crescimento e parâmetros hematológicos de tambaquis (*Colossoma macropomum*). Mestre, Universidade Federal doTocantins.

Shiogiri, N. S., M. G. Paulino, S. P. Carraschi, F. G. Baraldi, C. Cruz and M. N. Fernandes (2012). "Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*." Environmental toxicology and pharmacology **34**: 388–396.

Silva, C. A., C. A. Oliveira-Ribeiro, A. Katsumiti, M. L. P. Araújo, E. M. Zandoná, G. P. Costa Silva, J. Maschio, H. Roche and H. C. SIilva de Assis (2009). "Evaluation of

waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. ." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 400-409.

Song, L., M. G. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg, T. S. Galloway and C. R. Tyler (2015). "A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish." Chemosphere **139**: 181-189.

Spencer, P., R. Pollock and M. Dubé (2008). "Effects of un-ionized ammonia on histological, endocrine, and whole organism endpoints in slimy sculpin (*Cottus cognatus*)." Aquatic Toxicology **90**: 300–309.

Takashima, F. and T. Hibiya (1995). An atlas of fish histology. Normal and pathogical features.

Thomson, R. G. (1978). Patologia geral veterinária.

Thophon, S., M. Kruatrachue, E. S. Upatham, P. Pokethitiyook, S. Sahaphong and S. Jaritkuan (2003). "Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. ." Environmental pollution. **121**: 307-320.

Tolosa, E. M. C., C. J. Rodrigues, O. A. Behmer and A. G. Freitas-Neto (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica.

Troncoso, I. C., J. Cazenave, C. Bacchetta and M. A. Bistoni (2012). "Fish Physiol Biochem." Fish Physiol Biochem **38**: 693–702.

Valon, M., A. Valbona, E. Sula, G. Fahri, K. Dhurata and G. Fatmir (2013). "Histopathologic Biomarker of Fish Liver as Good Bioindicator of Water Pollution in Sitnica River, Kosovo." Global Journal of Science Frontier Research Agriculture and Veterinary **13**(5): 40-44.

Van Der Oost R., J. Beyer and N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology **13**: 57-149.

Viana, A. P., F. L. Frédou, C. S. Montes and R. M. Rocha (2013). "Fish histopathology and catalase activity as biomarkers of the environmental quality of the industrial district on the Amazon estuary, Brazil." Acta Scientiarum **35**(3): 395-401.

Vieira, D. B. and O. A. Shibatta (2007). "Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil." Biota Neotropica **7**(1): 57-65.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). "The stress response in fish." Physiological Reviews **77**(3): 591-625.

Winkaler, E. U., A. G. Silva, H. C. Galindo and C. B. R. Martinez (2001). "Histological and physiological biomarkers to monitor the health of streams of fish Londrina, Paraná State." Acta Scientiarum **3**(2): 507-514.

Capítulo 2 - Alterações branquiais em Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) e Metynnis maculatus (Kner, 1858) durante tratamento contra a ictiofitiríase

Fragmentos do presente capítulo estão contidos no artigo: Zeni, T. O., Horodesky, A., Castilho-Westphal, G. G., Ostrensky, A. **Analysis of tissue alterations and quantitative histopathological indices in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) and *Metynnis maculatus* (Kner, 1858) during treatment of Ichthyophthiriasis**. Annual Research & Review in Biology, 8 (5): 1-10, 2015.

Resumo

A histopatologia é uma ferramenta amplamente utilizada em investigações de doenças em peixes, dentre elas a ictiofitiríase, uma parasitose que pode provocar lesões teciduais de diferentes graus de severidade e levar os animais rapidamente à morte. O presente estudo teve por objetivos descrever e quantificar as alterações teciduais observadas em *Rhamdia quelen* (jundiá) e em *Metynnis maculatus* (pacu) durante o tratamento contra a ictiofitiríase. Para isso foram utilizados três índices. O Índice do Órgão (I_{org}) representa o grau de dano causado pela alteração ao órgão analisado. O Índice de Impacto Branquial estabelece a relação entre o número de lamelas branquiais afetadas por determinada alteração (IIBR) ou pelo somatório das alterações (IIBRT), em relação ao número total de lamelas branquiais analisadas. O Índice de Alteração Histopatológica (IAH), por sua vez, classifica as alterações branquiais em três estágios, de acordo com o comprometimento das funções do órgão analisado e classifica o tecido em cinco categorias de danos que vão desde o funcionamento normal do tecido até dano irreversível. O estudo foi realizado durante a ocorrência de um evento não induzido de infestação de lotes de peixes mantidos em cativeiro pelo cilióforo *Ichthyophtirius multifiliis.* Imediatamente após o diagnóstico da doença, os peixes foram medicados e monitorados quanto à prevalência e a evolução das alterações histológicas branquiais. Para isso, foram coletados e analisados animais nos dias 0, 10, 20, 30, 40 e 100, em relação ao início do tratamento. Foram identificadas e descritas 12 alterações histológicas ao longo das coletas realizadas. Entretanto, não foi observada relação de nexo causal entre as alterações observadas e a parasitose analisada. A aplicação dos índices quantitativos sugere que a dinâmica das alterações branquiais pode ocorrer de maneira distinta para *R. quelen* e para *M. maculatus,* entretanto também devem ser consideradas as diferentes respostas obtidas por cada índice, visto que cada um dos três apresenta características diferentes. O uso dos índices como ferramenta de avaliação da severidade dos danos provocados pela parasitose ao tecido branquial, portanto, deve ser aplicado e interpretado com cautela, considerando as diferentes respostas que podem ser apresentadas pelas diferentes espécies e pelos diferentes índices.

Palavras chave: parasitose, histopatologia, *Ichthyophtirius multifiliis*, índice de Bernet, índice de Cardoso

Abstract

This study aimed to describe and quantify tissue changes observed in *Rhamdia quelen* (catfish) and *Metynnis maculatus* (pacu) during treatment against ichthyophthiriasis. For this they used three indices. The Organ Index (I_{org}) is the degree of harm caused by the change to the analyzed organ. The Branchial Impact Index establishes the relationship between the number of gill lamellae affected by a particular change (IIBR) or the sum of changes (IIBRT), relative to the total number of gill lamellae analyzed. The Histopathological Alteration Index (HAI), in turn, classifies gill changes in three stages, according to the impairment of body functions analyzed and classifies tissue in five categories of damage ranging from the normal functioning of the tissue to damage irreversible. The study was conducted during the occurrence of an event not induced infestation of lots of fish kept in captivity by *Ichthyophtirius multifiliis*. Immediately after the diagnosis of the disease, the fish were medicated and monitored the prevalence and evolution of gill histological changes. For this, animals were collected and analyzed on days 0, 10, 20, 30, 40 and 100, relative to the start of treatment. They were identified and described 12 histological changes along the collections made. However, there was no causal relationship between the alterations observed and analyzed parasitosis. The application of quantitative indices suggests that the gill dynamic changes may occur differently for *R. quelen* and *M. maculatus*, but must also be considered the different responses obtained from each index, since each of the three displays different characteristics. The use of indices as assessment tool on the severity of the damage caused by the parasite to gill tissue, therefore, must be applied and interpreted with caution, considering the different responses that can be displayed by the different species and the different indexes.

Keywords: parasitic disease, *Ichthyophtirius multifiliis*, histology, Bernet index, Cardoso index

Introdução

A Ictiofitiríase é uma parasitose causada pelo protozoário cilióforo *Ichthyophtirius multifiliis,* popularmente denominado “ictio” (Melancon 1995). Quando em estágio trofonte, *I. multifiliis* é um parasito obrigatório, que infesta brânquias, pele, olhos e nadadeiras de peixes (Pavanelli, Eiras et al. 1998, Brandão 2004). Este

parasito é histiófago, hematófago e alimenta-se também de secreções, podendo provocar lesões teciduais significativas (Eiras 1994, Pavanelli, Eiras et al. 1998).

Animais infestados tendem a se atritar contra superfícies, ou mesmo entre si, provocando lesões cutâneas, aumentando assim a secreção de muco que, quando em excesso nas brânquias, pode dificultar as trocas gasosas (Eiras 1994) e até causar a morte do hospedeiro (Brandão 2004). Além disso, injúrias causadas por estas fricções podem ser a porta de entrada para infecções secundárias, elevando ainda mais a taxa de morbidade dos peixes (Pavanelli, Eiras et al. 1998).

A histopatologia é uma ferramenta amplamente utilizada em investigações de doenças em peixes (Neškovic, Poleksic et al. 1996, Jiraungkoorskula, Upathama et al. 2002, Akaishi, Silva de Assis et al. 2004, Cardoso 2006, Langiano and Martinez 2008, Albinati, Moreira et al. 2009, Khan, Sikdar-Bar et al. 2011). As vantagens do uso da histopatologia estão relacionadas ao baixo custo das análises e à possibilidade de obtenção de resultados rápidos (Johnson, Stehr et al. 1993). Entretanto, a falta de padronização metodológica na análise e na interpretação dos resultados pode dificultar a comparação entre estudos realizados por diferentes autores ou até mesmo levar a conclusões imprecisas e incorretas dos resultados. Por este motivo, recomenda-se a aplicação de índices quantitativos, que permitam não apenas a representação numérica dos dados, mas também a realização de análises estatísticas para interpretação dos resultados (Dalfovo, Lana et al. 2008), assim como o monitoramento da evolução das alterações teciduais em uma determinada população ao longo do tempo.

O presente estudo teve por objetivo descrever e quantificar as alterações teciduais observadas em *Rhamdia quelen* (jundiá) e em *Metynnis maculatus* (pacu)

durante o tratamento de lotes de indivíduos dessas duas espécies contra a ictiofitiríase.

Material e Métodos

Exemplares de *R. quelen* e de *M. maculatus* foram adquiridos na Central de Abastecimento do Paraná S/A (Ceasa), em Curitiba, PR, Brasil, e transportados em sacos plásticos contendo 1/3 de água e 2/3 de oxigênio, até o Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Em laboratório, os animais passaram por manejo de rotina para aclimatação à temperatura (23°C ± 2°C) e ao pH (7,2). Após foram submetidos a um banho profilático, aplicado com sal (NaCl) iodado (6 g/L) por duas horas (Brandão 2004). Após o banho, os peixes foram transferidos para tanques de polietileno (1.000 L), dotados de sistema fechado de filtragem física e biológica. Os tanques foram mantidos sob aeração constante e temperatura controlada. Os animais foram diariamente alimentados, *ad libitum,* com ração comercial peletizada, contendo 35% de proteína bruta.

Após 20 dias em laboratório, os peixes começaram a apresentar sinais de alterações comportamentais características de infestação por *I. multifiliis* (animais concentrados próximos às fontes de ar, friccionando-se intensamente entre si e rejeitando o alimento fornecido). Neste tanque (Tanque 1) haviam sido estocados 500 exemplares de *R. quelen* (3,96 ± 1,8 g (média ± desvio padrão), 6,85 ± 0,9 cm); e 500 exemplares de *M. maculatus* (7,60 ± 3,2 g; 6,56 ± 1,0 cm). Após 10 dias, *M. maculatus* estocados em um segundo tanque (Tanque 2) (n= 261, 16,7 ± 5,3 g; 9,01 ± 0,9 cm) passaram a apresentar os mesmos sinais e mortalidade.

Após os registros dos primeiros sinais clínicos, a doença foi confirmada por meio de raspados de brânquias e pele. Imediatamente foi iniciado tratamento medicamentoso. No tanque 1 o tratamento utilizado foi uma solução composta por 6 g/L de verde malaquita, 3 g/L de azul de metileno, 3 g/L de sulfato de magnésio, 2 g/L de cloreto de potássio, 10 g/L de sulfato de cobre, adicionada na proporção de 1 mL de solução/40L água, a cada 48h, por 20 dias. Antes de cada aplicação era realizada troca parcial (20%) da água do tanque (200 L). No tanque 2 foram diagnosticadas infecções secundárias causadas por bactérias e fungos. Por isso, o tratamento já descrito foi complementado com oxitetraciclina, na proporção de 0,91 g/kg de peso vivo, uma vez ao dia, por dez dias.

Ao longo do tratamento foram monitoradas as concentrações de oxigênio dissolvido, a temperatura (oxímetro digital portátil, YSI 550A, USA) e o pH (pHmetro de bancada AZ86505, Brasil) na água dos tanques. As análises de nitrito e amônia total (N-AT=NH_3+NH_4^+) foram realizadas por espectrofotometria pelos métodos de indofenol (APHA, 2005), seguido por determinação por espectofotometria (Spectronic 20 Genesys, Inglaterra). A amônia não ionizada (N-NH_3), por sua vez, foi analisada de acordo com o método descrito por Ostrensky, Marchiori et al. (1992). Diariamente os animais eram observados para análise comportamental e a mortalidade era registrada.

Para histopatologia, no dia 0 foram coletados de cada um dos tanques 15 indivíduos de cada espécie. Nos dias 10, 20, 30 e 40, após o diagnóstico, foram coletados 10 indivíduos de cada espécie. Após as coletas, os peixes foram submetidos à secção medular, análise biométrica e, em seguida, amostras de pele foram retiradas abaixo da linha lateral do lado esquerdo do corpo. Fragmentos de fígado e rim medindo de 2-3 mm de espessura (Tokumaru, Godinho et al. 1968),

assim como um arco branquial do lado direito de cada peixe (Winkaler, Silva et al. 2001, Fernandes, Cardoso et al. 2007) foram coletados. Os tecidos foram fixados em solução de Davidson (ALFAC) (Mela, Randi et al. 2007) e submetidos ao procedimento histotécnico de rotina, em Processador Histológico (Leica TP1020) e cortado em Micrótomo Rotativo (Leica RM2125RT, Alemanha) com 5 µm de espessura. Lâminas permanentes foram coradas em hematoxilina de Harris e eosina (Behmer, Tolosa et al. 1976), em um Corador Automático (Leica XL, Alemanha). Utilizaram-se, como controle, peixes das espécies em estudo, coletados em ambos os tanques, 100 dias após o início do tratamento.

Para identificação das alterações teciduais as lâminas permanentes foram analisadas em microscópio de contraste de fase Olympus BX41 (Japão), em aumento de 40X. Para confirmação de pequenas alterações era necessário usar aumento de 100X com óleo de imersão. A análise quantitativa das alterações teciduais foi realizada segundo metodologias propostas por Bernet, Schmidt et al. (1999) (modificado), por Cardoso (2006) e por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) (modificado).

O método proposto por Bernet, Schmidt et al. (1999) baseia-se na relevância patológica da alteração observada (w) e na extensão das lesões observadas (α). O Índice do Órgão (I org), por sua vez, representa o grau de dano apresentado pelo órgão analisado.

$$\mathrm{Iorg} = \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha \text{ or rp alt x } w \text{ or rp alt})$$

Onde: org (órgão); rp (padrão de reação); alt (alteração); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração).

O Índice de Impacto proposto por Cardoso (2006), por sua vez, não considera a severidade das lesões, apenas sua ocorrência e prevalência. Quando da avaliação

branquial, as lamelas de cinco filamentos são analisadas e as alterações observadas são registradas. O IIBr (Índice de Impacto Branquial) pode ser, portanto, calculado individualmente para cada patogenia, podendo apresentar valores variando de zero (valor mínimo, evidenciando a ausência de alterações histológicas) a 1,0 (valor máximo, evidenciando alterações em todos os filamentos analisados).

$$IIBR = (N_1/N_2).$$

Onde: N_1= n° de lamelas alteradas e N_2= n° de lamelas analisadas.

Posteriormente foi feita a soma dos Índices de Impacto Branquial de todas as lamelas analisadas.

$$\mathrm{IIBRT} = \sum_{i=1}^{5} \mathrm{IIBR_n}$$

Onde: IIBRT – Índice de impacto Branquial Total; $IIBR_n$ - Índice de Impacto Branquial da lamela n.

O método descrito por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994), por sua vez, classifica as alterações branquiais em três estágios, de acordo com o comprometimento das funções do órgão analisado. Estágio I - alterações que não comprometem o funcionamento do órgão. Estágio II – alterações que prejudicam o funcionamento normal do órgão e estágio III - alterações severas e irreversíveis. A partir desta classificação é realizado o cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), que é calculado para cada animal utilizando a fórmula:

$$IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$$

Onde: I, II e III correspondentes ao número de alterações de estágio I, II e III.

O valor médio de IAH é classificado em cinco categorias de danos, sendo que de 0-10 considera-se o funcionamento normal do tecido; 11-20 o dano é considerado de leve a moderado; 21-50 o dano é moderado a severo; 51-100 o dano passa a ser considerado severo e maior que 100 considera-se que o dano causado ao tecido é irreversível.

Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p<0,05$). Como não se ajustavam a uma distribuição normal, foram então analisados pelos métodos de Mann Whitney, Kolmogorov Smirnov e de Kruskal-Wallis. Os dados relativos aos *M. maculatus* dos tanques 1 e 2 foram tratados de forma agrupada, por não apresentarem diferenças significativas entre si.

A comparação direta entre os índices histopatológicos avaliando as duas espécies foram realizados pelos testes de Kolmogorov Smirnov e de Mann Whitney, ao nível de significância de 5%. Todos os testes estatísticos foram realizados através do software Statistica 8.0®.

Resultados

Qualidade de água

Os resultados relativos ao monitoramento dos parâmetros de qualidade de água dos tanques 1 e 2, podem ser observados na Tabela 5. A temperatura foi mantida próxima aos 24°C, as concentrações de oxigênio dissolvido em aproximadamente 5 mg/L e o pH entre 7,2 e 7,5. A amônia não ionizada não ultrapassou 0,05 mg/L e o nitrito foi mantido abaixo de 0,3 mg/L. Estas condições ambientais foram consideradas ambientalmente adequadas para as duas espécies (Baldisserotto and Silva 2004).

Tabela 5. Média (desvio padrão) dos valores quantificados de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD) (mg/L), pH, nitrito (NO_2) (mg/L), amônia total (N-AT= NH_3+NH_4^+) (mg/L) e amônia não ionizada (N-NH^3) (mg/L) nos tanques de manutenção de peixes ao longo do tratamento contra ictiofitiríase.

Parâmetros	**Monitoramento**	
	Tanque 1	**Tanque 2**
Temperatura	24,4 (±0,5)	24,8 (±0,7)
OD	5,5 (±0,5)	5,6 (±0,3)
pH	7,5 (±0,3)	7,2 (±0,1)
NO_2	0,244 (±0,293)	0,126 (±0,062)
N-AT	0,939 (±0,652)	0,641 (±0,403)
N-NH_3	0,020 (±0,018)	0,005 (±0,003)

Em ambos os casos (tanques 1 e 2), os tratamentos aplicados foram eficientes no combate à ictiofitiríase (Tabela 6). No tanque 1 a mortalidade cessou completamente após 7 dias, e no tanque 2 após o sexto dia. Em ambos os tanques, um dia antes do registro da última morte, os peixes já nadavam e alimentavam-se normalmente.

Tabela 6. Variação temporal do número de indivíduos mortos e comportamento dos peixes infestados por *Ichthyophtirius multifiliis* durante tratamento medicamentoso.

	Tanque				
	1*			**2****	
Dia	**Mortalidade**		**Comportamento**	**Mortalidade**	**Comportamento**
	***M. maculatus* (n=500)**	***R. quelen* (n=500)**		***M. maculatus* (n=261)**	
1	3	0	Peixes nadando de forma agrupada na superfície do tanque e próximos a entrada de água e com hiporexia.	4	Anorexia
2	2	1		40	Peixes na superfície da água, nadando próximos uns aos outros e anoréxicos.
3	8	7	Peixes nadando de forma agrupada na superfície e com anorexia	0	Anorexia. Peixes nadando ativamente na coluna d'água.
4	0	0		5	
5	2	0		1	
6	0	0	Peixes nadando menos agrupados.	0	Peixes alimentando-se e nadando normalmente.
7	1	0	Peixes alimentando-se e nadando normalmente.	0	
8	0	0		0	

Análises macroscópicas e histopatológicas

Os raspados de brânquias e pele no dia zero revelaram a presença de *I. multifiliis* na fase trofonte, caracterizada pelo núcleo em formato de ferradura. No dia em que o tratamento no tanque 2 foi iniciado, os animais apresentavam ulcerações na superfície do corpo, profundas o suficiente para provocar a exposição de tecido muscular. Após 5 dias de tratamento havia apenas animais com lesões epidérmicas e no 10° dia não era mais possível detectar animais com lesões macroscópicas visíveis.

Através da histopatologia, os parasitos foram registrados apenas no dia zero, ou seja, antes do início do tratamento. Não foram encontradas evidências de que as eventuais alterações teciduais hepáticas e renais apresentavam qualquer relação de nexo causal com a doença em análise, por isso, não foram consideradas para efeitos deste estudo.

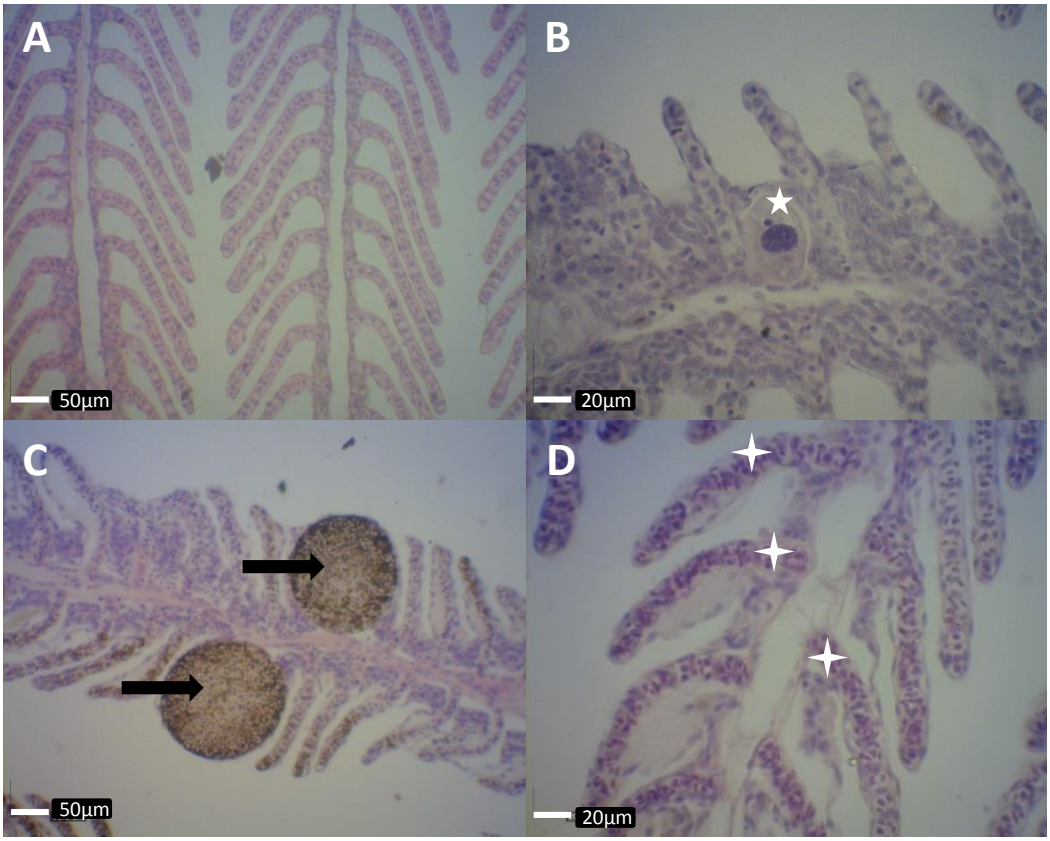
Não foram observadas alterações macroscópicas nas brânquias de *M. maculatus* e de *R. quelen*. Lesões epidérmicas e branquiais foram registradas antes do início do tratamento terapêutico em ambos os tanques.

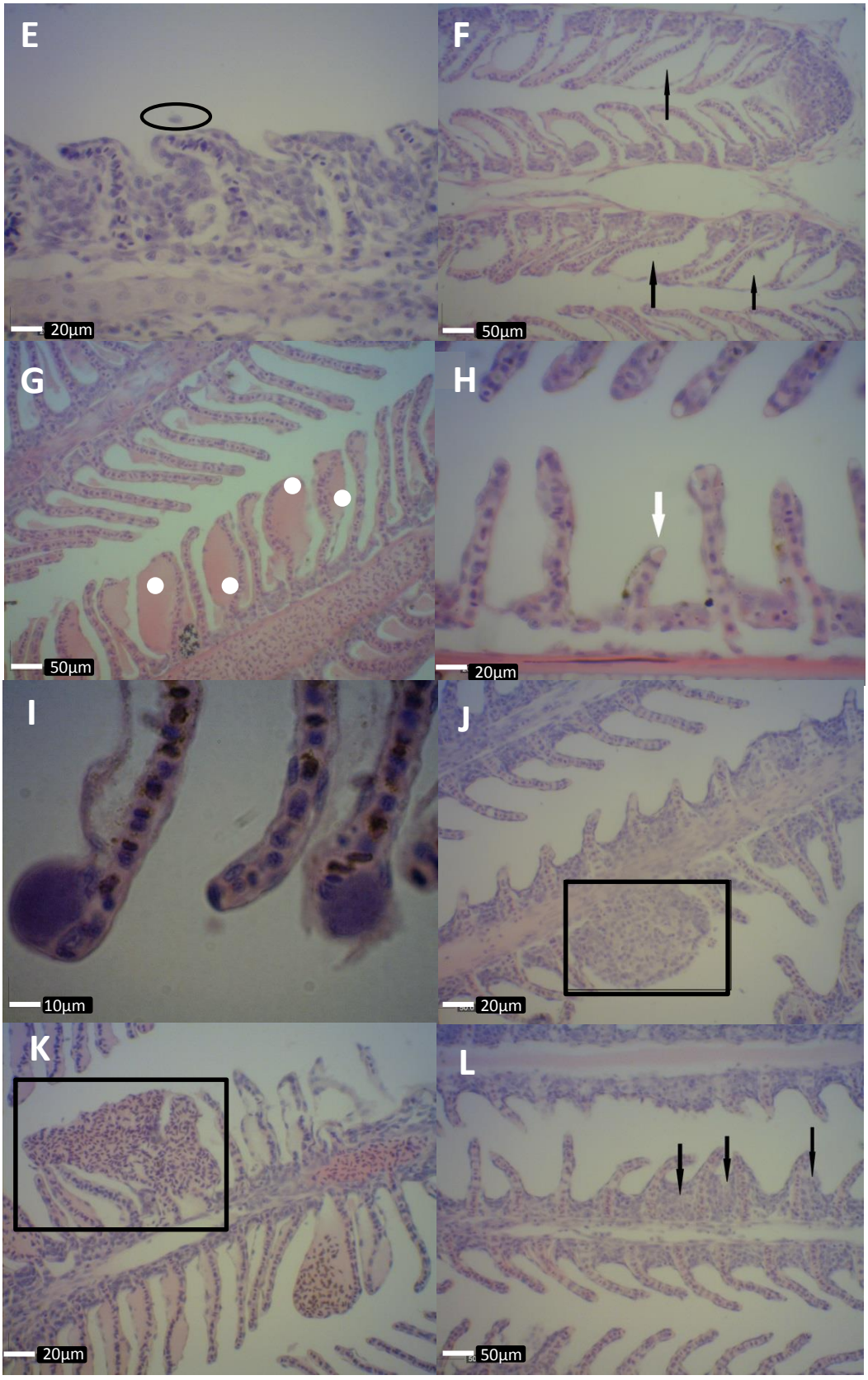
Doze alterações teciduais foram identificadas nas brânquias analisadas no decorrer dos 100 dias de observação (Tabela 7 e Figura 6).

Tabela 7. Alterações observadas em tecido branquial de *Rhamdia quelen* (jundiás) e *Mettynis maculatus* (pacus) infestados por *Ichthyophtirius multifiliis*.

Alterações teciduais	Descrição
Aneurisma	Acúmulo anormal de sangue dentro de vasos sanguíneos, em decorrência da perda da integridade vascular.
Congestão	Aumento do volume sanguíneo em uma determinada região.
Descamação epitelial	Destruição do epitélio pavimentoso simples que envolve as lamelas branquiais, com ruptura e separação de células, provavelmente, como resultado de um processo de morte celular.
Epiteliocistose	Geralmente é uma infecção benigna, embora lesões proliferativas também sejam relatadas. *Rickettsia* sp. ou *Chlamydia* sp. podem ser agentes causais da epiteliocistose, no entanto, o verdadeiro status taxonômico desses organismos permanece desconhecido.
Fusão de lamelas	Em decorrência da hiperplasia do epitélio de revestimento, há fusão

Alterações teciduais	Descrição
branquiais	entre lamelas branquiais, causando redução na área de trocas gasosas.
Hemorragia	Extravasamento sanguíneo do leito vascular.
Hiperplasia	Aumento na quantidade de células, sem que elas sofram alteração morfofuncional, podendo ocorrer fusão de lamelas e, mais raramente, de filamentos.
Hipertrofia	Aumento do volume celular, sem que ocorram mitoses ou meioses.
Lamelas em regeneração	Processo em que há reposição de lamelas alteradas, por lamelas integras novas.
Perda de adesão epitelial	Separação do epitélio simples pavimentoso de revestimento das lamelas de sua membrana basal, formando extensas áreas com acúmulo de líquido intersticial.
Perda de adesão epitelial com acúmulo de líquido eosinofílico (edema)	Extravasamento de líquido eosinofílico para o espaço extracelular sub-epitelial, provocando a separação física entre o epitélio branquial e sua membrana basal.
Vacuolização	Presença de vacúolos intracitoplasmáticos em células do epitélio branquial.




E
20µm
F
50µm
G
50µm
H
20µm
I
10µm
J
20µm
K
20µm
L
50µm

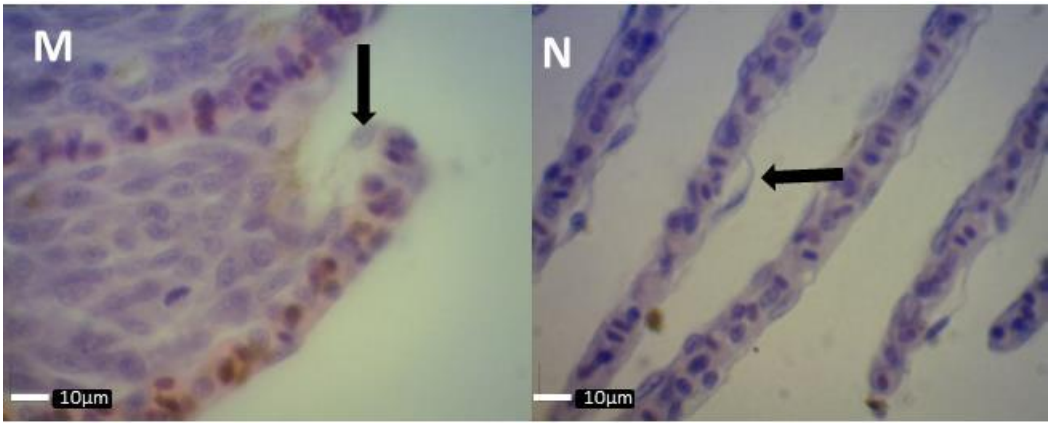


Figura 6. Fotomicrografia de brânquias infestadas por *Ichthyophthirius multifiliis* e coradas com HE (hematoxilina e eosina). A) brânquias com morfologia normal; B) parasita; C) aneurisma; D) congestão; E) descamação de epitélio; F) perda de adesão epithelial; G) edema; H) lamela em regeneração; I) epiteliocistose; J) fusão; K) hemorragia; L) hiperplasia; M) hipertrofia e N) vacuolisação.

A presença de parasitos nas brânquias foi observada apenas na primeira coleta (dia 0), em ambas as espécies. Estes, por sua vez, estavam envoltos por uma camada de tecido epitelial.

Lamelas em regeneração, epiteliocistose e hemorragia somente foram observadas em exemplares de *M. maculatus*. Descamação, por sua vez, somente foi verificada em *R. quelen*.

Houve maior prevalência de perda de adesão epitelial, edema e hiperplasia em ambas as espécies (Tabela 8). Estas três alterações, entretanto, foram observadas em todas as coletas, mostrando que as alterações não apresentaram qualquer padrão de distribuição de prevalência relacionado à evolução da doença ou ao tratamento aplicado.

Apenas epiteliocistose, em exemplares de *M. maculatus*, foi observada apenas no dia 0, quando constatada a presença do parasito. As demais alterações foram observadas ao longo das demais coletas.

Nenhuma das alterações observadas diminuiu após o encerramento do tratamento (dia 100 em relação ao dia 40), mostrando que o medicamento não influenciou no surgimento de alterações nas brânquias.

Tabela 8. Frequência (%) de exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* com alteração branquial após infestação por *Ichthyophtirius multifiliis*.

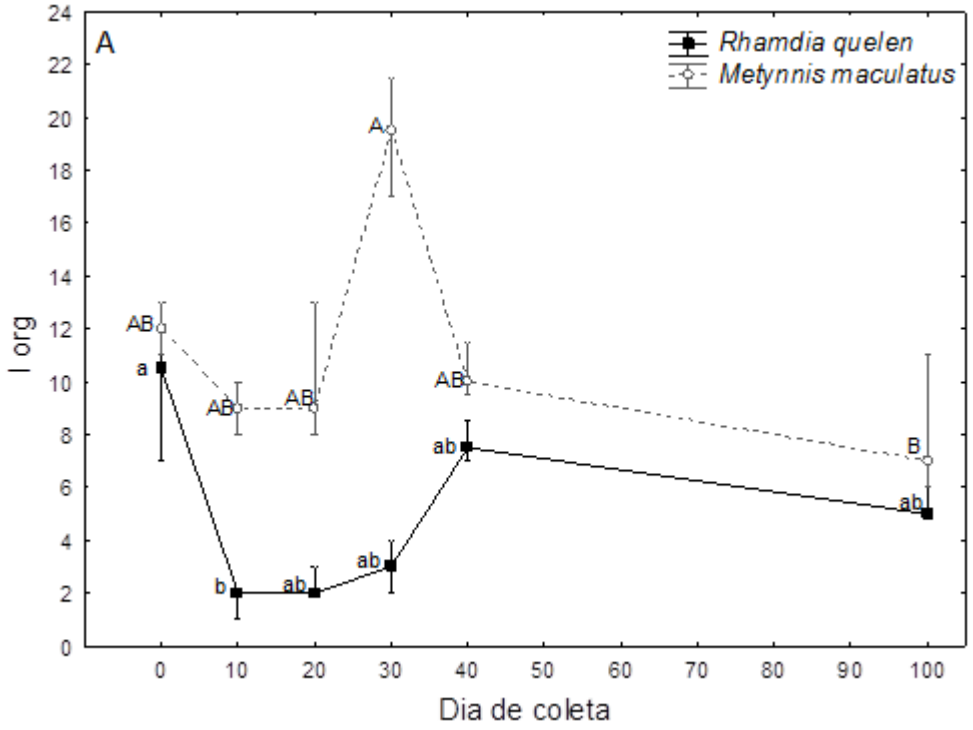
Alteração	Dia de coleta											
	R. quelen						*M. maculatus*					
	0[1]	10[2]	20[2]	30[2]	40[2]	100[2]	0[3]	10[4]	20[4]	30[4]	40[4]	100[4]
Aneurisma	20	0	0	10	0	0	23	40	25	20	5	5
Congestão	67	20	0	0	0	40	3	0	0	0	0	5
Descamação	20	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0	0
Edema	93	40	80	60	90	80	70	90	95	95	85	50
Em regeneração	0	0	0	0	0	0	7	0	5	0	5	0
Epiteliocistose	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
Fusão	53	0	0	0	0	10	23	10	15	10	5	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
Hiperplasia	93	60	50	80	10	40	77	55	45	25	10	20
Hipertrofia	27	0	20	10	10	10	17	0	5	0	0	0
Perda de adesão epitelial	100	80	90	100	100	80	70	85	100	90	85	45
Vacuolização	0	20	10	0	0	0	3	0	0	0	0	0

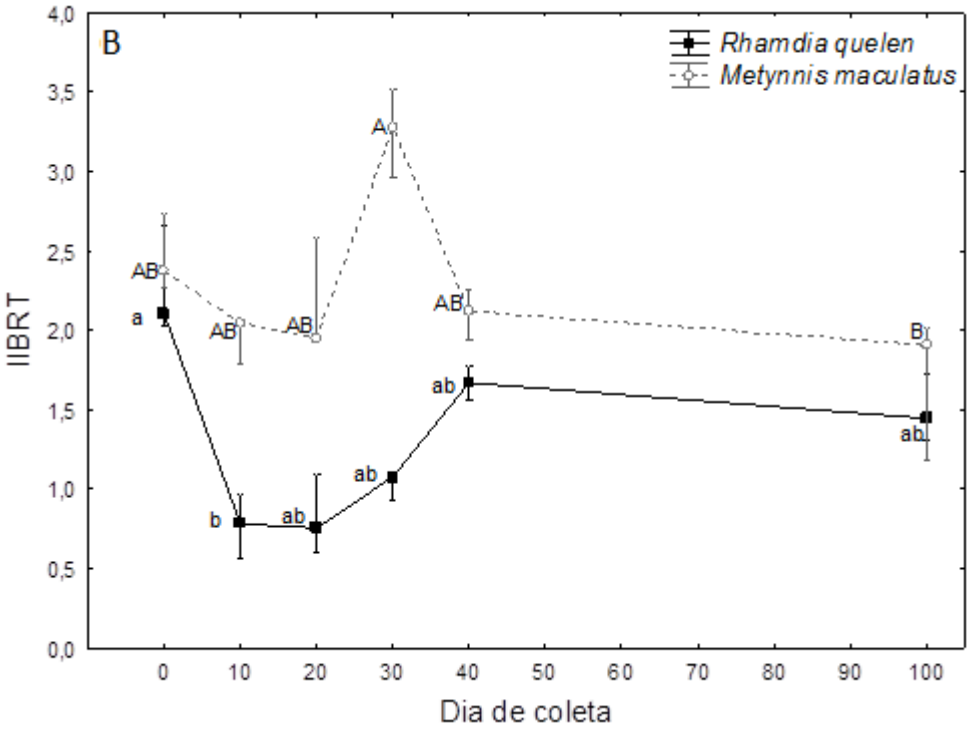
[1] n=15; [2] n=10; [3] n=30; [4] ;n=20.

Aplicação dos índices de alteração tecidual

Com o objetivo de avaliar a evolução das alterações teciduais causadas pela doença, os índices histopatológicos obtidos foram comparados separadamente para cada uma das espécies estudadas. A análise das curvas de variação desses índices mostra uma diferença significativa nos primeiros dez dias de tratamento para exemplares de *R. quelen,* enquanto para exemplares de *M. maculatus* é observada apenas uma tendência de redução do índice. Após esse período, no entanto, esses índices passaram a variar de forma distinta entre si e entre as duas espécies.

Diferenças significativas ($p<0,05$) entre o início (dia 0) e o final do período de monitoramento (100 dias) foram observadas apenas quando utilizado o IAH para *M. maculatus.* Nos demais casos, essa diferença não foi significativa (Figura 7).


A
Rhamdia quelen
Metynnis maculatus
I org
Dia de coleta
AB
a
AB
AB
A
AB
B
b
ab
ab
ab
ab


B
Rhamdia quelen
Metynnis maculatus
IIBRT
Dia de coleta
AB
a
AB
AB
A
AB
B
b
ab
ab
ab
ab

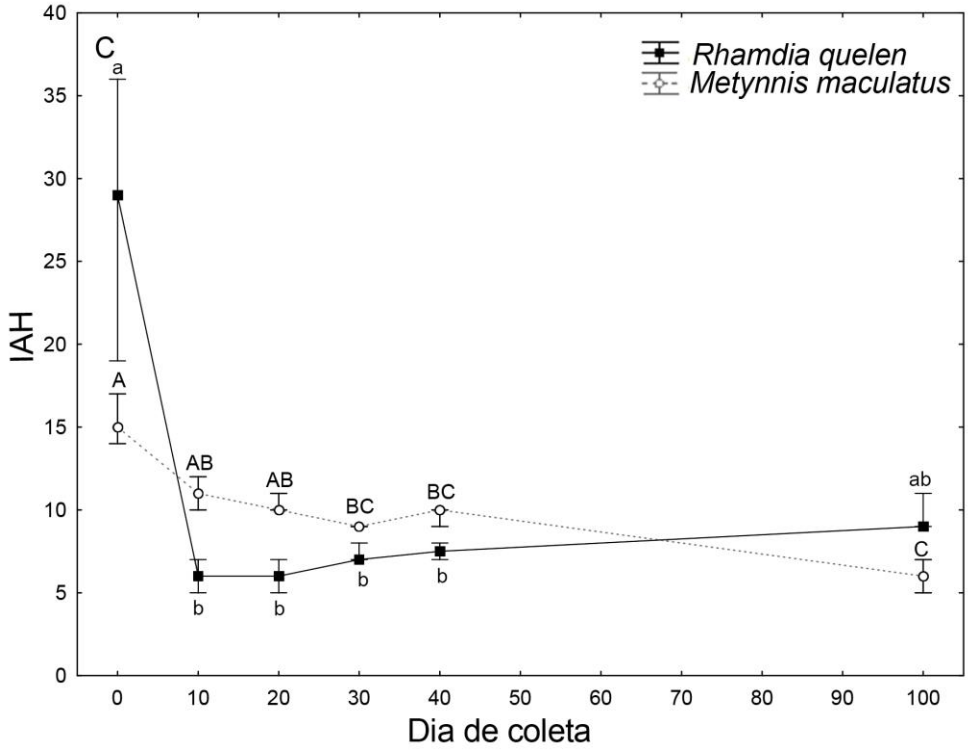


Figura 7. Evolução dos índices branquiais (mediana, 40-60%) observadas para *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* infestados pelo parasito *Ichthyophtirius multifiliis*. A. Índice do Órgão (I org), B. IIBRT (Índice de Impacto Branquial Total). C. IAH (Índice de Alterações Histológicas). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) para cada espécie estudada, pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05).

Os índices atribuídos a cada espécie foram comparados entre si, através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Mann Whitney. As análises indicaram que os exemplares de *M. maculatus* apresentaram índices de alteração tecidual mais elevados que os quantificados para *R. quelen* quando usados os índices I_{org} e IIBrT. Quando usado o IAH, entretanto, não foi observada diferença entre as duas espécies estudadas (Tabela 9).

Tabela 9. Grau de lesões observadas para os índices de Bernet (I org), Cardoso (IIBRT) e Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) (p<0,05) aplicados para *Rhamdia quelen* (Rq) e *Metynnis maculatus* (Mm) infestados pelo parasito *Ichthyophtirius multifiliis*.

ìndice	**Kolmogorov-Smirnov**	**Mann-Whitney**
I_{org}	Mn>Rq	Mn>Rq
IIBrT	Mn>Rq	Mn>Rq
IAH	Mn=Rq	Mn=Rq

Discussão

Além da função respiratória, as brânquias são responsáveis pelo equilíbrio osmótico dos peixes e sua integridade é fundamental para a manutenção das funções vitais desses animais. Por isso, parasitoses branquiais, como a causada por *I. multifiliis,* podem provocar danos estruturais ou funcionais em seus hospedeiros, podendo levá-los a morte (Campos, Moraes et al. 2011).

Embora Martins and Romero (1996), estudando os efeitos de parasitoses em *Piaractus mesopotamicus,* tenham relatado o encapsulamento de *I. multifiliis* e de um outro parasito - *Henneguya* sp. - nas brânquias de peixes infestados*,* no presente estudo, não foi registrado o encapsulamento dos parasitos. Ao invés de uma cápsula de tecido conjuntivo, verificou-se a presença de uma delgada camada de tecido epitelial sobre o parasito.

A administração associada de sulfato de cobre, azul de metileno e verde de malaquita, cujas propriedades parasiticidas são relatadas por diversos autores (Luchini 1988, Ling, Sin et al. 1993, Carneiro, Schorer et al. 2005, Carneiro, Cirio et al. 2006), foi eficiente para combater a parasitose estudada.

Segundo Ferraz de Lima, Reis et al. (1991), a presença de "ictio" provoca compressão de capilares sanguíneos, dificultando assim a respiração, comprometendo a sobrevivência dos peixes. O tratamento utilizado neste trabalho eliminou, em curto prazo, os parasitos presentes nas brânquias dos indivíduos das duas espécies, reduzindo rápida e definitivamente o problema da mortalidade, tanto que entre o 8º dia e o final do tratamento (100º dia) nenhuma morte foi registrada.

Porém, mesmo com a eliminação completa dos parasitos logo no início do tratamento e com o controle total da mortalidade após uma semana, ainda assim foram identificadas 12 alterações branquiais durante as seis coletas realizadas,

gerando dúvida sobre a existência ou não de nexo causal, direto ou indireto, entre tais alterações e a ocorrência da parasitose. Além disso, havia dúvidas se os índices de alterações teciduais aplicados refletiriam ou não a severidade dos danos provocados pela parasitose.

Estudos relacionados à infestação de peixes por “ictio” relatam a ocorrência de inúmeras alterações branquiais associadas ao *I. multifilis*. Juvenis de *P. mesopotamicus* infestados por "ictio" apresentaram reação inflamatória com repercussão hemorrágica, hiperplásica do epitélio branquial e fusão de lamelas (Ferraz de Lima, Reis et al. 1991). Segundo Dickerson and Dawe (1995) a natureza e a gravidade das alterações observada em peixes infestados por *I. multifiliis* podem variar muito, visto que o grau de severidade das alterações é influenciado por fatores como o estresse a que o hospedeiro estava previamente submetido e ao seu estado nutricional.

Segundo Pádua, Shikawa et al. (2013) infestações branquiais maciças causadas por este parasito podem induzir a severa hiperplasia epitelial, bem como, causar hiperplasia das células produtoras de muco e fusão das lamelas secundárias. Em situações mais graves, segundo estes autores, podem ser observadas zonas de necrose nas brânquias dos animais infestados. De acordo com Moreira, Vargas et al. (2001) a diminuição dos espaços interlamelares, que ocorre em função da presença dos parasitos, limita significativamente a área de trocas gasosas. Por este motivo, o organismo do peixe reage aumentando o número de células epiteliais próximas para melhorar a captação de oxigênio. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com a informação de que a hiperplasia epitelial pode ser observada em infestações parasitárias. Entretanto, como esta alteração foi observada em todas as coletas, é

muito provável que outros fatores, além do "ictio", possam levar á a ocorrência de tal alteração.

Nenhum dos estudos aqui citados e que se basearam em análises histopatológicas branquiais, para avaliação dos efeitos causados por parasitoses em peixes, mencionavam qualquer informação sobre o grau de alteração tecidual na população estudada, antes do estabelecimento da doença ou após a cura dos animais. Desta maneira, e baseado no que foi observado neste estudo, não é possível corroborar a relação de nexo causal entre a doença e as alterações observadas pelos respectivos autores.

Outro ponto importante é a forma como as alterações teciduais são tratadas e analisadas pelos diferentes autores. Muitos estudos já realizados consideram apenas a observação e a descrição das alterações, sem aplicar nenhum índice quantitativo para avaliar os possíveis danos causados, ou mesmo, para descrever a evolução dessas alterações (Eiras, Pavanelli et al. 1999, Benli and Koksal 2005, Velmurugan, Selvanayagam et al. 2009, Campos, Moraes et al. 2011, Jalaludeen, Arunachalam et al. 2012). Outros estudos, como é o caso de Jacob, Nandini et al. (2012), fazem uso do índice proposto por Bernet, Schmidt et al. (1999), entretanto, os autores não comentam qual ou quais dos índices propostos por Bernet foram aplicados. Por fim, nenhum dos artigos avaliados durante a realização deste estudo e que utilizaram o índice de Bernet apresentam os resultados numéricos obtidos com a aplicação desse índice, nem descrevem a variação temporal do mesmo.

No presente caso, foi possível observar que, entre os dias 0 e 10, houve uma tendência de diminuição dos índices de alteração tecidual para ambas as espécies. Essa tendência era esperada e foi corroborada pela análise comportamental e de mortalidade dos peixes nos tanques de manutenção, além da não identificação de

parasitos nas brânquias imediatamente após o início do tratamento. Assim, caso essa tendência fosse mantida e caso os índices estudados fossem influenciados exclusivamente pela parasitose em questão, seria esperado que ocorresse uma diminuição sequencial e significativa das taxas de alteração tecidual ao longo do tempo. Entretanto, ao final do tratamento (100 dias), embora sem nenhuma evidência de recorrência da parasitose, os índices estudados (com exceção do IAH calculados para *M. maculatus*) voltaram a aumentar, o que leva à suposição de que não apenas a doença foi o fator responsável pelas alterações teciduais registradas.

Não se pode descartar a hipótese de que mesmo situações de rotina, consideradas normais durante o manejo de peixes em cativeiro, podem influenciar no surgimento de alterações branquiais. Aneurisma, por exemplo, é citada como uma alteração que pode estar associada a traumas físicos ou químicos. Segundo Santos (2010), esta alteração é usualmente observada após o manejo de peixes em cativeiro, mas também pode estar associada a lesões parasitárias, resíduos metabólicos ou contaminantes químicos presentes na água. O fato é que não foi identificado nenhum fator biológico ou ambiental que pudesse explicar o recrudescimento dos índices de alteração teciduais após o 10º dia de observação. Por fim, como não houve mais mortes, mesmo após o aumento dos Índices de Alteração Branquiais, não é possível associar tais índices ou mesmo as alterações teciduais observadas, ao aumento do risco de morte dos peixes.

Baseado nos resultados obtidos no presente estudo, levantam-se duas hipóteses. A primeira seria que a severidade das alterações teciduais é um fator espécie-específico. As duas espécies estudadas, mesmo quando submetidas a condições ambientais e nutricionais adequadas, apresentaram diferenças

significativas nas alterações teciduais identificadas. *M. maculatus* apresentou índices consistentemente mais elevados que *R. quelen* quando aplicados I_{org} e o IIBrT.

A segunda hipótese é que as diferentes abordagens inerentes a cada índice influenciam nos resultados e nas interpretações analíticas. O índice proposto por Cardoso (2006) foca no tamanho e na prevalência da alteração, já o proposto por Bernet, Schmidt et al. (1999) considera o número de lamelas alteradas em relação ao total de lamelas analisadas. O índice de Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994), considera apenas o comprometimento das funções do órgão analisado e os multiplica por 10^0, 10^1 ou 10^2, de acordo com o estágio em que a alteração é classificada. Desta forma, o fato do índice de Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) não levar em consideração o tamanho da lesão, fazendo com que pequenas e grandes alterações tenham a mesma importância, pode ter contribuído decisivamente para a inexistência de diferenças estatisticas significativas entre *R. quelen* e *M. maculatus*,

Deve-se considerar também que os índices de Bernet, Schmidt et al. (1999) e Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) tiveram de ser modificados no presente estudo para incluir alterações como a epiteliocistose, as lamelas em regeneração e a vacuolização.

Não houve evidências de que as alterações observadas ao longo do estudo apresentaram uma relação de nexo causal com a parasitose analisada ou com o medicamento utilizado, mostrando que a histopatologia permite a inferência de resultados, entretanto, estes não são exclusivos para um tipo de agente estressor.

Referências

Akaishi, F. M., H. C. Silva de Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eirasstofella, S. D. St-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira Ribeiro (2004). "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**(2): 244-253.

Albinati, A. C. L., E. L. T. Moreira, R. C. B. Albinati, J. V. Carvalho and L. A. D. (2009). "Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*)." Arq. Bras. Med. Vet. Zootec **61**(3): 621-627.

Baldisserotto, B. and L. V. F. Silva (2004). The quality of the water. In: Bernardo Baldisserotto; João Radünz Neto. (Org.). Criation of "jundiá".

Behmer, O. A., E. M. C. Tolosa and A. G. Freitas-Neto (1976). Manual de técnicas histológicas para histologia normal e patológica.

Benli, A. A. K. and G. Koksal (2005). "The Acute Toxicity of Ammonia on Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Larvae and Fingerlings." Turk J Vet Anim Sci **29**: 339-344.

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic poluttion." Journal of fish disease **22**: 25-34.

Brandão, D. A. (2004). Profilaxia e Doenças. In: Baldisserotto & Radünz Neto. Criação de jundiá.

Campos, C. M., J. R. E. Moraes and F. R. Moraes (2011). "Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes,1836) infested by monogenean and myxosporea, caugth in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul, Brazil." Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária **20**(1): 67-70.

Cardoso, M. F. (2006). Effects of seismic with bottom cable on reef fish master's degree - http://livros01.livrosgratis.com.br/cp011737.pdf, Federan University of Paraná.

Carneiro, P. C. F., S. M. Cirio and M. Schorer (2006). "Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por Ichthyophtirius multifiliis e

submetidos a tratamentos convencionais. ." Archives of Veterinary Science **11**(1): 33-38.

Carneiro, P. C. F., M. Schorer and J. D. Mikos (2005). "Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophtirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*)." Pesq. agropec. bras. **40**(1): 99-102.

Dalfovo, M. S., R. A. Lana and A. Silveira (2008). "Métodos quantitativos e qualitativos: um resgate teórico. ." Revista Interdisciplinar Científica Aplicada **2**(4): 01-13.

Dickerson, H. W. and D. L. Dawe (1995). "Ichthyophthirius multifiliis and Cryptocaryon irritans (Phylum Ciliophora). In: Woo P (ed) Fish diseases and disorders. CAB International, Wallingford." **181-227**.

Eiras, J. C. (1994). Elementos de ictioparasitologia. Porto, Portugal, Fundação Eng. Antônio de Almeida.

Eiras, R. C., G. C. Pavanelli, M. J. T. Paiva and R. M. Taketmoto (1999). "Gill histopathology of *Piaractus mesopotamicus* (osteichthyes: serrasalmidae) infected by *Henneguya piaractus* martins et souza, 1997 (myxozoa: myxobolidae). ." Research and Reviews in Parasitology **59**(3-4): 117-120.

Fernandes, A. F., J. V. F. Cardoso, S. G. Santos, S. M. Monteiro, J. Carrola, P. Matos and A. F. Fernandes (2007). "Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus,* exposed to waterborne copper." Pesquisa veterinária brasileira **27**(3): 103-109.

Ferraz de Lima, C. L. B., N. S. Reis and P. S. Ceccarelli (1991). "Caracterização histológica da ictiofitiriase em pacu, *Piractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae)." Boletim Técnico CEPTA **4**(2): 8.

Jacob, J., N. J. Nandini and P. Natarajan (2012). "Histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in *Mystus gulio* (Hamilton)." J. Recent Trends Biosci., **2**(1): 10-17.

Jalaludeen, M. D., M. Arunachalam, M. Raja, S. Nandagopal, S. A. B., S. Sundar and D. Palanimuthu (2012). "histopathology of the gill, liver and kidney tissues of the freshwater fish *Tilapia mossambica* exposed to cadmium sulphate." I.J.A.B.R., **2**(4): 572-578.

Jiraungkoorskula, W., E. S. Upathama, B. M. Kruatrachuea, S. Sahaphongc, S. Vichasri-Gramsa and P. Pokethitiyooka (2002). "Histopathological effects of roundup,

a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Science Asia **28**: 121-127.

Johnson, L. L., C. M. Stehr, O. P. Olson, M. S. Myers, S. M. Pierce, C. A. Wigren, B. B. McCain and U. Varanasi (1993). "Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States." Environmental Science and Technology **27**(13): 2759-2771.

Khan, H. A., M. Sikdar-Bar, Kamlesh B, A. W. Adil and Pervaiz A. (2011). "Lead nitrate induced histopathological changes in the gills of the african catfish *Clarias batrachus*." Journal of Applied Sciences Research **7**(7): 1087-1092.

Langiano, V. C. and C. R. B. Martinez (2008). "Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus.*" Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **147**: 222-231.

Ling, K. H., Y. M. Sin and T. J. Lam (1993). "Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (Carassius auratus)." Aquaculture **118**(1-2): 23-25.

Luchini, L. M. (1988). "Produccion de “bagre negro” o "catfish sudamericano”. ." Revista Argentina de producción animal **8**(5): 433-439.

Martins, M. L. and N. G. Romero (1996). "Efectus del parasitismo sobre el tegido branquial en peces cultivados : Estudio parasitológico e histopatológico." Revista Brasileira de Zoologia **13**(2): 489-500.

Mela, M., M. A. Randi, D. F. Ventura, C. E. Carvalho, E. Pelletier and C. A. O. Ribeiro (2007). "Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*." Ecotoxicoligal and environmental safety **68**: 426–435.

Melancon, M. J. (1995). Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Jr.; Cairns, J., and Jr. editors. Handbook of ecotoxicology.

Moreira, H. L. M., L. Vargas, R. P. Ribero and S. Zimmermann (2001). Fundamentos da moderna aqüicultura.

Neškovic, N. K., V. Poleksic, I. Elezovic, V. Karan and M. Budimir (1996). "Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. ." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **56**: 295-302.

Ostrensky, A., M. A. Marchiori and L. H. Poersch (1992). "Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de P*enaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967." Anais da Academia Brasileira de Ciências **64**(4): 383-389.

Pádua, S. B., M. M. Shikawa, A. S. Ventura, G. T. Jerônimo, M. L. Martins and L. E. R. Tavares (2013). "Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae), with description of parasite intensity score." Parasitology research **112**: 443-446.

Pavanelli, G. C., J. C. Eiras and R. M. Takemoto (1998). Fish diseases: prophylaxis of fish - prevention, diagnosis and treatment.

Poleksic, V. and V. Mitrovic-Tutundzic (1994). Fish gills as a monitor of sublethalc and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Oxford, Fishing News Books.

Santos, D. M. S. (2010). Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. . Doutorado em Medicina Veterinária - Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP Jaboticabal.

Tokumaru, M., H. Godinho and A. G. Ferri (1968). "Fresh water fish tissue fixation." Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo **7**(4): 841-848.

Velmurugan, B., M. Selvanayagam, E. P. Cengiz and E. Unlu (2009). "Histopathological Changes in the Gill and Liver Tissues of Freshwater Fish, *Cirrhinus mrigala* Exposed to Dichlorvos." Brazilian archives of biology and technology **52**(5): 1291-1296.

Winkaler, E. U., A. G. Silva, H. C. Galindo and C. B. R. Martinez (2001). "Histological and physiological biomarkers to monitor the health of streams of fish Londrina, Paraná State." Acta Scientiarum **3**(2): 507-514.

Capítulo 3 - Efeitos do sal iodado na histopatologia branquial e hepática de jundiás (Rhamdia quelen) e de pacus (Metynnis maculatus)

Zeni, T. O., Vicente, A. L., Castilho-Westphal, G. G., Horodesky, A., Montanhini-Neto, R. Ostrensky, A. Effects of iodised salt on the histopathology of the gills and liver in Rhamdia quelen and Metynnis maculatus. Fragmentos do presente capítulo estão contidos no artigo ceito para publicação na Aquaculture Research em 29/02/2016.

Resumo

O sal de cozinha (cloreto de sódio iodado) é utilizado como substância de referência em estudos toxicológicos com peixes e também como agente antiparasitário na aquicultura. O presente trabalho teve por objetivo testar a sensibilidade de *Rhamdia quelen* (jundiá) e *Metynnis maculatus* (pacu), ao sal refinado e utilizar a histopatologia branquial e hepática como biomarcador da exposição dos animais ao sal. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, os peixes foram expostos, de forma aguda, a diferentes concentrações de sal por 96 horas, para cálculo das concentrações letais médias (CL_{50}) em 24, 48, 72 e 96 h. No segundo experimento, foi realizada a exposição subcrônica (40 dias) dos peixes ao sal. As brânquias e o fígado dos animais utilizados no experimento subcrônico foram submetidos ao processamento histológico de rotina, observados sob microscópio óptico e analisados, utilizando-se índices quantitativos. A toxicidade do sal iodado para *R. quelen* foi de 11,4 g/L e a de *M. maculatus* foi de 10,8 g/L após 96 horas de exposição. Nenhuma das alterações observadas no fígado pode ser correlacionada inequivocamente à exposição ao sal. Por outro lado, há evidências de que determinadas alterações branquiais (como perda de adesão epitelial, edema e congestão) foram provocadas pela exposição dos peixes ao sal. Não foram observados efeitos dose-resposta nas brânquias e no fígado dos peixes expostos ao sal.

Palavras-chave: substância de referência, biomarcador, sensibilidade

Abstract

The salt (iodized sodium chloride) is used as reference substance in toxicology studies with fish and also as antiparasitic agent in aquaculture. This study aimed to test the sensitivity of *Rhamdia quelen* (catfish) and *Metynnis maculatus* (pacu), the refined salt and use gill and liver histopathology as a biomarker of exposure of animals to salt. Two experiments were conducted. At first, the fish were exposed acutely to different salt concentrations for 96 hours to calculate the median lethal concentration (LC_{50}) in 24, 48, 72 and 96 h. In the second experiment, the subchronic

exposure (40 days) fish salt was carried out. The gills and liver of animals used in subchronic experiment were subjected to histological processing, observed under light microscope and analyzed using quantitative indices. The toxicity of the *R. quelen* iodized salt was 11.4 g/L and *M. maculatus* was 10.8 g/L after 96 hours of exposure. None of the changes observed in the liver can be correlated unequivocally to exposure to salt. Moreover, there is evidence that certain changes gill (such as loss of epithelial adhesion, congestion and edema) was caused by exposure of fish to salt. There were no dose-response effects in the gills and liver of the fish exposed to salt.

Keywords: reference substance, biomarker, sensitivity

Introdução

Marcadores biológicos, ou biomarcadores, podem ser definidos como ferramentas biológicas mensuráveis, que variam em função do tempo de exposição e/ou da concentração de contaminantes a que um organismo foi exposto (Gagnon and Hodson 2012). Desta forma, um biomarcador pode funcionar como um indicador de estresse nos diferentes níveis de organização biológica (Muñoz, Weber et al. 2015). Seu uso pode evidenciar alterações de parâmetros morfológicos, respostas bioquímicas, fisiológicas (Melancon 1995), comportamentais, celulares e energéticas, assim como alterações em fluídos corpóreos de organismos expostos a xenobiontes (xenobióticos) (Livingstone 1993).

Um biomarcador muito útil em estudos dos efeitos agudos e crônicos de xenobióticos em peixes e também na caracterização de doenças neles manifestadas é a histopatologia por microscopia de luz. Essa técnica, por sua vez, pode ser associada à aplicação de índices quantitativos para tornar os resultados obtidos em diferentes estudos mais claros e comparáveis.

Testes de toxicidade, por sua vez, são métodos utilizados para se detectar e avaliar a capacidade inerente de um determinado agente tóxico em produzir efeitos deletérios aos organismos-teste (Cruz, Cubo et al. 2008).

Uma das importantes ferramentas em testes de toxicidade envolve a utilização de substâncias de referência, empregadas para se realizar comparações entre os resultados obtidos em testes de toxicidade, na calibração laboratorial, na comparação de métodos que usam diferentes organismos e na avaliação de reprodutibilidade e validação de testes de toxicidade (Hunt and Anderson 1989, Resgalla Jr. and Laitano 2002). Substâncias de referências permitem ainda uma melhor compreensão dos efeitos de xenobióticos sobre organismos aquáticos (Jorge and Moreira 2005). Podem, por fim, revelar diferenças na sensibilidade de lotes de um mesmo organismo-teste em função de fatores como aclimatação, ocorrência de doenças, densidade utilizada e nível de estresse a que os organismos foram submetidos antes da realização dos testes (Ong and Din 2001).

Uma substância de referência ideal, portanto, deve ser tóxica em baixas concentrações, rapidamente letal, estável, não seletiva, detectável por técnicas analíticas conhecidas e ser capaz de fornecer resultados laboratoriais consistentes (Ong and Din 2001). Também é desejável que seja amplamente disponível no mercado, facilitando sua aquisição; que seja reconhecidamente utilizada em estudos científicos; abranja diferentes classes de utilização (como em produtos farmacêuticos, biocidas, ou produtos químicos industriais), apresente especificidade de resposta tóxica (por exemplo, em fígado, brânquias, sangue ou sistema nervoso (Hoffmann, Kinsner-Ovaskainen et al. 2010). Por atender grande parte desses pré-requisitos, o sal (NaCl) é considerado uma substância de referência adequada para uso em ensaios toxicológicos (USEPA 2002, ABNT 2004).

O sal iodado, ou sal de cozinha, apesar de possuir iodo em sua composição, é um micromineral essencial para todas as espécies animais (Miller and Ammerman

1995), mas que em excesso pode ser tóxico aos peixes (He, Fu et al. 2014). Apesar disso é amplamente utilizado na aquicultura de água doce.

O sal é empregado, por exemplo, durante o transporte de peixes vivos, reduzindo a diferença osmótica entre o meio externo e o plasma dos peixes e, dessa forma, reduzindo o estresse e aumentando a resistência dos animais a doenças, (Wurts and Durborow 1992, Garcia, Becker et al. 2007, Oyoo-Okoth, Cherop et al. 2011, Tacchi, Lowrey et al. 2015). Também é utilizado diretamente no tratamento e na prevenção de doenças causadas por fungos, bactérias e parasitos (Anderson 1992, Wangen 2012).

Se usado corretamente, o sal refinado é seguro tanto para os peixes, quanto para os ecossistemas aquáticos (Altinok and Grizzle 2003, Garcia, Becker et al. 2007, Wangen 2012). Entretanto, em excesso ele pode também causar disfunção osmorregulatória nestes animais (Barton and Zitzow. 1995), levando-os ao aumento no consumo de oxigênio (Maceina, Nordlie et al. 1980, Wang, Lui et al. 1997, Altinok and Grizzle 2003) e diminuição na ingestão de alimento, fatores que afetam o seu crescimento (Luz, Martínez-Álvarez et al. 2008).

O presente trabalho teve por objetivo testar a sensibilidade de *Rhamdia quelen* (jundiá) e *Metynnis maculatus* (pacu), ao sal refinado e utilizar a histopatologia branquial e hepática como biomarcadora da exposição dos animais ao sal.

Material e Métodos

Acondicionamento dos exemplares

Os exemplares de *R. quelen* (jundiá) e de *M. maculatus* (pacu) foram adquiridos de uma distribuidora comercial de peixes, localizada no município de

Curitiba/PR, Brasil. Os animais foram acondicionados e transportados em sacos plásticos (contendo 1/3 água e 2/3 oxigênio puro) até o Laboratório de Pesquisas com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA/UFPR), Curitiba/PR, onde os experimentos foram realizados.

Os peixes foram submetidos à aclimatação gradual à temperatura e ao pH dos tanques de recepção. Após isso, foram submetidos a um banho profilático em água e sal (6 g/L), por duas horas (Ferraz de lima, Reis et al. 1991). Posteriormente, foram acondicionados em tanque de polietileno (1000 L) contendo filtro biológico interno, mantidos sob aeração constante (oxigênio dissolvido 6,0 ± 1 mg/L), temperatura controlada (25 ± 1 °C) e pH de 7,2. Diariamente os animais eram alimentados, *ad libitum*, com ração comercial peletizada contendo 35% de proteína bruta.

Período experimental

Foram realizados experimentos independentes e sequenciais de exposição aguda e subcrônica ao sal iodado (sal de cozinha). Cada espécie foi testada separadamente.

A água utilizada nos experimentos era potável e oriunda da rede de abastecimento público. A água era previamente acondicionada em tanques de 500L de polietileno, clorada (0,20 mL NaClO/L) e mantida sob aeração forte para a eliminação do cloro residual. Em seguida, esta água era acondicionada em tanques de polietileno de 1.000 L contendo filtro biológico interno, mantida sob aeração constante (oxigênio dissolvido 6,5 ± 1 mg/L) e temperatura controlada (25 ± 1 °C), até a sua utilização nas unidades experimentais.

Experimento piloto

Para definição das concentrações utilizadas no experimento agudo os peixes (densidade de 5 animais/aquário) foram submetidos, por 96 horas, sob aeração e temperatura controladas, fotoperíodo 12L/12E, a nove concentrações de sal (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15 g/L). Nenhum peixe exposto às concentrações de 7, 8 e 9 g/L morreram, enquanto que nas salinidades acima de 12 g/L a mortalidade foi de 100% dos indivíduos expostos.

Experimento agudo

O experimento foi conduzido de acordo com a metodologia de determinação de concentração letal (CL_{50}) (EPA 2002), com algumas modificações. Diferente da metodologia padrão, onde são usadas dez concentrações do agente tóxico, foram utilizadas apenas cinco concentrações com o objetivo de reduzir o número de animais necessários para realização do experimento, sem comprometimento dos resultados.

Antes do início do experimento, os animais foram aclimatados às condições experimentais por 96 horas (Agamy 2013). Ao final desse período o sal iodado foi inserido no sistema. Os peixes (*R. quelen:* 5,15 ± 1,21 g e *M. maculatus:* 4,76 ± 1,15 g), foram expostos às concentrações do sal (9, 10, 11, 12 e 13 g/L) em aquários de vidro (12 L) em condições controladas (aeração e temperatura controladas (25°C $\pm$1) e fotoperíodo 12L /12E). Foram utilizados 7 animais por aquário (densidade próxima a 3 g de peixe/L de água, como sugerido por Miron, Moraes et al. (2008), sendo que todos os tratamentos (exposição e controle) foram realizados em triplicata.

O registro dos peixes mortos e dos parâmetros de qualidade de água foram monitorados em 0, 24, 48, 72 e 96h (CETESB 1990). As concentrações letais (CL_{50}) em 24, 48, 72 e 96h foram calculadas através do Software *LC50 Programs JSpearman Test*. O monitoramento da temperatura e das concentrações de oxigênio dissolvido foi realizado diretamente nos aquários experimentais com um oxímetro digital portátil (YSI 550A, USA). O pH foi determinado com o auxílio de pHmetro de bancada (AZ86505, Brasil). A determinação da amônia total (N-AT = NH_3+NH_4^+) foi analisada pelos métodos de indofenol (APHA, 2005), seguido por determinação por espectofotometria (Spectronic 20 Genesys, Inglaterra). O cálculo das concentrações de amônia não ionizada (N-NH_3) foi mensurado a partir dos valores de N-AT, temperatura e pH segundo metodologia proposta por Ostrensky, Marchiori et al. (1992).

Uma vez concluídas as análises para monitoramento da qualidade de água os peixes eram alimentados e o restante do alimento removido após dez minutos (Salazar-Lugo, Mata et al. 2011). Uma hora após a alimentação realizou-se a renovação de 100% do volume de água dos aquários.

Experimento subcrônico

Os exemplares de *R. quelen* (10,61± 1,45 g) e de *M. maculatus* (9,94 ± 2,15 g) foram aclimatados às condições experimentais por 96 horas (Agamy 2013). Ao final desse período o sal iodado foi inserido no sistema. Os peixes foram expostos a três concentrações do sal iodado (3, 6 e 9 g/L) em tanques de polietileno (60 L) nas mesmas condições controladas que no experimento de exposição aguda.

Foram utilizados 15 peixes por tanque, sendo que todos os tratamentos, inclusive o controle, foram testados em triplicata. Os peixes foram submetidos à

exposição subcrônica ao sal por 30 dias. Após esse período, os animais de todos os tratamentos foram transferidos para água doce (salinidade 0), onde foram mantidos por mais 10 dias, para avaliação da reversibilidade de eventuais lesões decorrentes da exposição ao sal (Galvan 2015).

Os registros dos parâmetros de qualidade da água foram realizados a cada 48h, seguindo os mesmos métodos descritos para o experimento agudo. Diariamente os peixes eram alimentados sendo que a ração era disponibilizada aos animais por 10 minutos e retirada após este período (Salazar-Lugo, Mata et al. 2011), de forma a se evitar a deterioração da qualidade da água. Aproximadamente 1 hora após a alimentação, a cada 48h, 50% do volume de água dos tanques era renovada.

Após 20, 30 e 40 dias do início do experimento, cinco indivíduos foram retirados de cada aquário, anestesiados com óleo de cravo (35 µL/L), submetidos à insensibilização por secção medular, eutanásia por hipovolemia e destinados a histopatologia.

Um tanque adicional também foi povoado com 15 peixes, mas, neste caso, os animais foram submetidos à eutanásia e destinados à histopatologia logo após encerrado o período de 96h de aclimatação (tratamento controle). O objetivo deste tratamento adicional foi o de avaliar as alterações presentes nos peixes em período anterior ao início do experimento.

Histopatologia

Após serem eutanasiados, os animais foram pesados (peso total medido com balança Sartorius analytic, Alemanha) e medidos (comprimento total e comprimento padrão, com paquímetro, Vonder, Brasil). A seguir, os peixes foram fixados em

ALFAC por 48 horas (Mela, Guiloski et al. 2013), sendo posteriormente coletado um arco branquial e um fragmento de fígado, os quais foram submetidos ao processamento histológico de rotina (Beçak and Paulete 1976). As peças foram seccionadas em micrótomo com cortes de 5 µm de espessura e coradas em hematoxilina de Harris e eosina (HE) (Horobin and Brancoft 1998).

As lâminas foram analisadas com o auxílio da câmera Dino® (2012) acoplada a um microscópio de contraste de fase Olympus BX41 (Japão), em aumento de 40X utilizando-se o software Dino® (2012). Para confirmação de pequenas alterações era necessário usar aumento de 100X com óleo de imersão.

As brânquias de todos os peixes eutanasiados, bem com o fígado de três peixes por unidade experimental, foram analisados a cada período experimental.

Foram utilizados três índices de impacto para análise das lâminas permanentes. Para análise branquial foram analisadas cinco lamelas branquiais de um corte histológico. Para análise hepática foram capturadas imagem de 5 campos em um corte histológico com aumento de 400 vezes (microscópio óptico).

O Índice do Órgão (I_{org}), que representa o grau de dano causado por uma determinada alteração ao órgão analisado (seguindo metodologia proposta por Bernet, Schmidt et al. (1999), conforme a fórmula:

$$\mathrm{Iorg} = \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha \text{ or rp alt x } w \text{ or rp alt})$$

Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração).

Já o Índice de Impacto Branquial estabelece a relação entre o somatório das alterações observadas (IIBR), em relação ao número total de lamelas branquiais analisadas para cada peixe (Cardoso 2006), conforme a fórmula:

$$IIBR = (N_1/N_2).$$

Onde: N_1= n° de lamelas alteradas e N_2= n° de lamelas analisadas.

Posteriormente foi feita a soma dos índices de impacto branquial de todas as lamelas analisadas.

$$\mathrm{IIBRT} = \sum_{i=1}^{5} \mathrm{IIBR_n}$$

Onde: IIBRT - índice de Impacto Branquial Total; $IIBR_n$ - Índice de Impacto Branquial da lamela n.

Para obtenção do Índice de Impacto Hepático foi realizada a mensuração da área total analisada e a mensuração da área alterada, diferenciando-se cada alteração diagnosticada. Deste modo foi possível calcular a extensão relativa dos danos provocados por cada lesão diagnosticada, segundo a seguinte equação:

$$IIH = (A_1/A_2).$$

Onde: A_1= área alterada e A_2= área total analisada.

Posteriormente foi feita a soma dos índices de impacto hepático

$$\mathrm{IIHT} = \sum_{i=1}^{5} \mathrm{IIH_n}$$

Onde: IIHT - Índice de Impacto Hepático total; IIH_n - Índice de Impacto Hepático da fotomicrografia n.

Por fim Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) classificam as alterações branquiais em três estágios, segundo o comprometimento das funções das brânquias. O estágio I considera as alterações que não comprometem o funcionamento das brânquias. O estágio II prejudica o seu funcionamento normal e o estágio III considera alterações severas e irreversíveis. A partir desta classificação é realizado o cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), que é calculado para cada animal utilizando a fórmula:

$$IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$$

Onde: I, II e III correspondentes ao número de alterações de estágio I, II e III.

O valor médio de IAH é classificado em cinco categorias de danos, sendo que o primeiro (0-10) considera o funcionamento normal do tecido e o último (superior a 100) considera que o dano causado nas brânquias é irreversível.

Os índices propostos por Bernet, Schmidt et al. (1999) e Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) tiveram de ser adaptados para inclusão de alterações como epiteliocistose, lamelas em regeneração e vacuolização, as quais não foram originalmente consideradas ou identificadas pelos respectivos autores.

Análises estatísticas

Os dados obtidos através das análises histopatológicas, assim como os dados relativos à qualidade de água, foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, para comparações dos resultados obtidos em diferentes concentrações e em diferentes períodos de exposição, foi aplicado o teste de *Kruskal-Wallis*. As comparações entre os resultados globais obtidos para as duas espécies testadas, por sua vez, foram realizadas utilizando-se o teste de Mann Whitney. Já as alterações teciduais específicas observadas nos tratamentos expostos ao sal em relação ao seu controle foram analisadas pelo teste de proporções. Todos os testes estatísticos foram realizados com auxílio do software Statistica 8.0®.

Resultados

Exposição aguda

Parâmetros de qualidade de água

Os resultados relativos ao monitoramento dos parâmetros de qualidade de água dos aquários podem ser observados na Tabela 10. Para exemplares de *R. quelen* não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos de exposição e controle. Para exemplares de *M. maculatus* a concentração de oxigênio dissolvido, bem como os valores de temperatura não apresentaram variação entre os tratamentos (p>0,05). Já o pH e as concentrações de N-AT e de N-NH3, apresentaram valores superiores nos tratamentos de exposição, em comparação aos tratamentos de controle (p<0,05).

Tabela 10. Mediana (mínimo e máximo) dos valores quantificados de temperatura (°C), oxigênio dissolvido (OD) (mg/L), pH, amônia total (N-AT= NH_3+NH_4^+) (mg/L) e amônia não ionizada (N-NH^3) (mg/L) nos experimentos de exposição de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* ao sal iodado.

Parâmetros	*R. quelen*		*M. maculatus*	
	Exposição	**Controle**	**Exposição**	**Controle**
Temperatura	25,4 (25,1- 26,0)	25,4 (25,0 – 25,9)	25,7 (25,1- 25,9)	25,7 (25,3 – 26,0)
OD	6,75 (6,5 – 7,0)	6,7 (6,5 – 7,2)	6,80 (6,5 – 7,0)	6,7 (6,5 – 6,9)
pH	7,3 (7,09 -7,5)	7,2 (6,7 – 7,4)	7,5 (7,3 -7,6)[a]	6,9 (6,5 – 7,5)[b]
N-AT	0,44 (0,36 – 0,79)	0,58 (0,28 – 0,80)	0,64 (0,51 – 0,99)[a]	0,35 (0,18 – 0,94)[b]
N-NH_3	0,004 (0,001 – 0,009)	0,005 (0,002 – 0,014)	0,009 (0,007-0,023)[a]	0,002 (0,000 – 0,010)[b]

Letras diferentes indicam diferenças significativas (P<0,05) para cada espécie estudada, entre tratamento de exposição e tratamento controle pelo teste de Mann Whitney.

Toxicidade

Durante a realização do experimento agudo foi possível observar que no controle e nas menores concentrações (9 e 10 g**/**L) os animais nadavam mais ativamente quando comparados aos animais expostos às maiores concentrações. Nas concentrações acima de 10 g**/**L os animais não se alimentavam desde o

primeiro dia de experimento. Nenhum animal do tratamento controle morreu durante o experimento.

A CL_{50} 96h calculada para os juvenis de *R. quelen* foi de 11,4 g*/*L (11,1 – 11,7), enquanto para *M. maculatus* foi de 10,9 g/L (10,6 – 11,3). A curva de toxicidade obtida para *R. quelen* praticamente não apresentou variações entre 24 e 96h. Já a estabilização da toxicidade do sal para *M. maculatus* aconteceu após 72h de exposição (Figura 8).

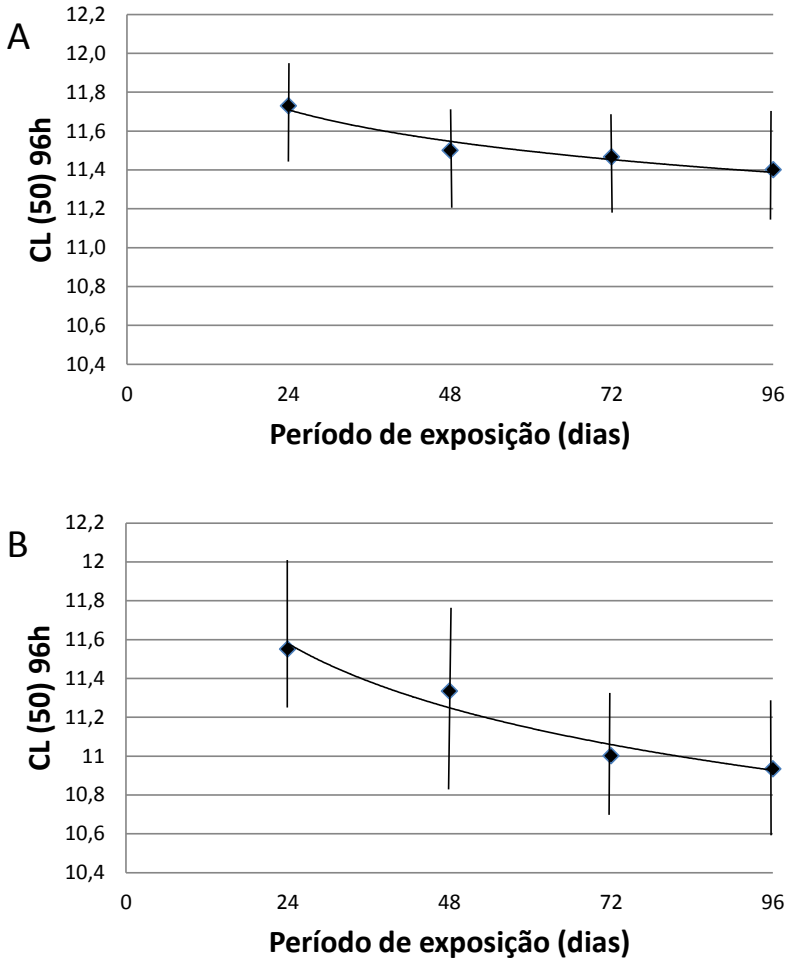


Figura 8. CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança, do sal iodado para (A) *Rhamdia quelen* e para (B) *Metynnis maculatus*.

Exposição subcrônica

Parâmetros de qualidade de água

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas (p>0,05) em nas variáveis hidrológicas medidas nos tratamentos em relação ao seu respectivo grupo controle. A temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido foram mantidas nos mesmos patamares do experimento agudo (25 ± 1°C; 6,5 ± 1,0 mg/L, respectivamente). O pH apresentou mediana variando de 7,23 a 7,28; a amônia total variou de 0,40 a 0,66 mg/L de N-AT e a amônia não ionizada apresentou mediana variando de 0,003 a 0,006 mg/l de $N\text{-}NH_3$ (Tabela 11).

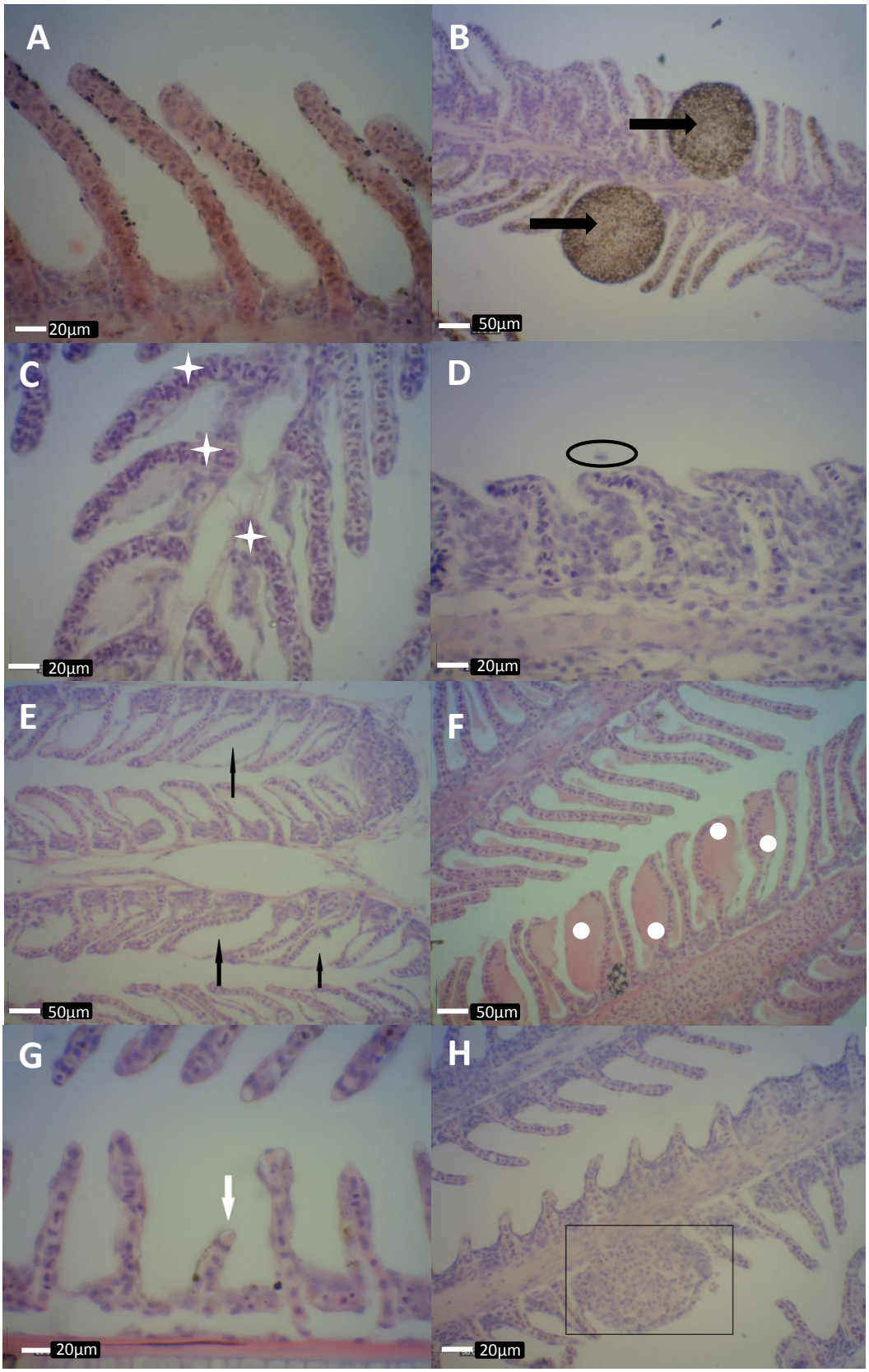
Tabela 11. Mediana (mín-máx) dos valores de oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C), pH, amônia total (N-AT= NH 3+NH4 +) (mg/L) e amônia não ionizada (N-NH3) (mg/L) no experimento de exposição aguda ao sal iodado para as espécies *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*[*].

Parâmetros	**Espécie**			
Parâmetros	***R. quelen***		***M. maculatus***	
	Exposição	**Controle**	**Exposição**	**Controle**
OD	6,3 (5,8 – 6,9)	6,5 (6,0 – 7,1)	6,3 (5,9 – 6,9)	6,41 (5,87 – 6,41)
Temperatura (°C)	24,7 (24,0 – 25,9)	24,8 (14,0 – 25,9)	24,8 (24,0 – 25,9)	24,7 (24,0 – 25,9)
pH	7,26 (6,95 – 7,45)	7,23 (6,84 – 7,44)	7,28 (7,10 – 7,41)	7,28 (7,18 – 7,38)
N-AT	0,66 (0,23 – 5,40)	0,59 (0,24 – 7,22)	0,40 (0,19 – 0,87)	0,50 (0,40- 3,45)
$N\text{-}NH_3$	0,006 (0,001 -0,058)	0,006 (0,002 – 0,102)	0,003 (0,001 – 0,012)	0,005 (0,004 -0,013)

[*] Não houve diferença significativa entre exposição e controle.

Histopatologia branquial

Nas brânquias dos peixes expostos subcronicamente ao sal foram registrados onze tipos de lesões teciduais (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**), além da presença do parasito cilióforo *Ichthyophtirius multifiliis* em 13 exemplares de *R. quelen* e 8 exemplares de *M. maculatus.*


A
20µm
B
50µm
C
20µm
D
20µm
E
50µm
F
50µm
G
20µm
H
20µm

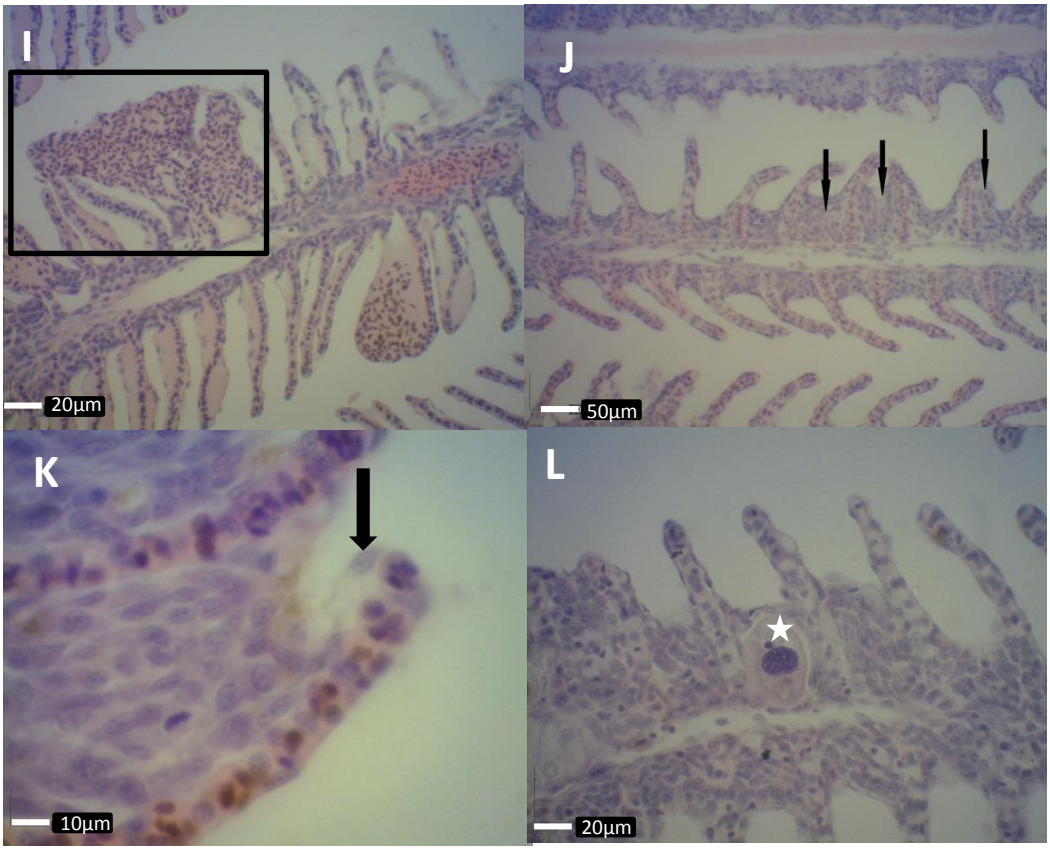


Figura 9. Fotomicrografia de brânquias de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* expostos ao sal iodado e corados com HE (hematoxilina e eosina). A) Acúmulo de pigmento; B) Aneurisma; C) Congestão vascular; D) Descamação epitelial; E) Epithelial lifting; F) Edema; G) Lamela em regeneração; H) Fusão de lamelas; I) Hemorragia; J) Hiperplasia de epitélio; K) Hipertrofia de epitélio; L) Parasito.

No caso de *R. quelen*, os animais expostos ao sal apresentaram maior prevalência de congestão, perda de adesão epitelial e edema que os animais do grupo controle. Mas, os resultados não se repetiram em relação à *M. maculatus*. Neste caso, diferenças significativas entre tratamento e controle foram registradas apenas em relação à fusão lamelar e à presença de parasitos. Em ambos os casos, com os animais do grupo controle apresentando maior prevalência que aqueles expostos ao sal (Tabela 12).

Tabela 12. Frequência (em %) de exemplares de *Rhamdia quelen* (jundiá) e *Metynnis maculatus* (pacu) com alterações branquiais nos grupos controle e tratamentos expostos ao sal iodado (NaCl). As letras indicam resultados significativamente distintos (p<0,05) entre tratamentos e controle de acordo com teste de proporções realizado.

Alterações	Frequência (%)			
	Rhamdia quelen		*Metynnis maculatus*	
	Tratamentos n= 135	Controle n= 60	Tratamentos n= 135	Controle n= 60
Acúmulo de pigmentos	0,74	0,00	0,00	2,00
Aneurisma	0,00	0,00	0,74	2,00
Congestão	25,19[a]	10,00[b]	6,67	8,00
Descamação de epitélio	0,74	2,00	0,00	0,00
Perda de adesão epitelial	64,44[a]	26,00[b]	73,33	62,00
Edema	37,04[a]	10,00[b]	66,67	54,00
Lamelas em processo de regeneração	4,44	0,00	0,00	0,00
Fusão de lamelas	4,44	2,00	3,70[b]	14,00[a]
Hemorragia	0,00	0,00	0,74	0,00
Hiperplasia epitelial	29,63	18,00	30,37	40,00
Hipertrofia epitelial	3,70	2,00	2,22	8,00

Foi possível observar um aumento do IIBrT para exemplares de *R. quelen* expostos a 9 g/L de sal. Os menores índices foram registrados 20 dias após o início do experimento e o maior após 40 dias, ou seja, 10 dias após a transferência dos animais para água sem concentrações significativas de sal. Quando usado o IIBrT também foi possível observar um padrão que se repetiu sempre 30 dias após o início do experimento. Nesse período de coleta, todos os índices calculados, em todas as concentrações, inclusive no controle, foram superiores para *M. maculatus* em relação aos obtidos para *R. quelen* (Tabela 13).

Quando os índices foram analisados de forma agrupada, ou seja, considerando-se o conjunto das alterações quantificadas nas diferentes concentrações de sal e nos diferentes tempos de exposição, ratificou-se que *M. maculatus* apresentou I_{org} e IIBrT superiores aos quantificados para *R. quelen*. Quando usado o IAH, entretanto, os índices obtidos para *R. quelen* foram superiores.

Observou-se ainda que o período de exposição teve influência significativa nos índices I_{org} e IIBRT calculados para *M. maculatus* e IIBRT calculado para *R. quelen*. Já as concentrações testadas assim como a interação entre o período de exposição e as concentrações de sal testadas apresentaram efeito significativo ($p>0,05$) apenas para o índice IAH calculado para *M. maculatus*.

Tabela 13. Índices de Alterações Branquiais propostos por Cardoso (2006) (IIBrT), por Bernet, Schmidt et al. (1999) (I_{org}) e por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994)(p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição ao sal iodado (NaCl) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*.

Tratamento	Conc. (g/L)	Período de exposição (dias)	Espécie					
			R. quelen	***M. maculatus***	***R. quelen***	***M. maculatus***	***R. quelen***	***M. maculatus***
			IIBrT		**I_{org}**		**IAH**	
Controle	0	4	0,87 (0,32 - 1,41)	1,00 (0,48 - 1,5)	7,5 (6,0 – 9,0)	7,0	12,5 (9,0 – 16,0)	7
	0	20	1,58 (0,78 - 2,27)	0,58 (0,32 - 1,04)	7,5 (5,0 – 11,0)	6,5 (5,0 – 10,0)	13,5 (10,0 – 25,5)	8,5 (6,5 – 16,5)
	0	30	$0,48^{B}$ (0,34 - 0,53)	$1,58^{A}$ (0,80 - 2,27)	5,5 (5,0 – 7,0)	9,0 (5,0 – 13,0)	16,0 (10,5 – 21,0)	13,0 (9,0 – 27,0)
	0	40	1,72 (1,11 - 2,71)	1,43 (0,86 - 2,12)	9,5 (8,0 – 13,0)	8,0 (5,0 – 10,3)	9,5 (8,0 – 12,0)	10,0 (10,0 – 16,0)
Exposição	3	20	0,33 (0,09 - 0,93)	$0,76^{b}$ (0,20 - 1,20)	5,5 (5,0 – 7,0)	6,5 (5,0 – 10,0)	26,0 (11,5- 40,0)	14,0 (7,0 – 26,0)
	3	30	$0,64^{B}$ (0,40 - 1,93)	$2,09^{aA}$ (1,11 - 4,00)	7,0 (5,0 – 13,0)	9,0 (5,0 – 13,0)	15,0 (9,0 – 19,0)	9,0 (8,0 – 10, 0)
	3	40	0,65 (0,10 - 1,38)	$1,39^{ab}$ (0,49 - 2,53)	6,0 (4,0 -11,0)	7,0 (5,0 – 10,0)	23,0 (7,5 – 35,5)	8,5 (7,5 – 10,0)
	6	20	0,96 (0,78 - 1,15)	1,08 (0,23 - 2,67)	8,0 (6,0 – 9,0)	8,0 (5,0 – 9,0)	9,0 (8,0 – 16,0)	18,5 (8,5 – 31,5)
	6	30	$0,73^{B}$ (0,18 - 1,08)	$1,61^{A}$ (0,84 - 2,92)	5,5 (4,0 – 10,0)	7,5 (5,0 -11,0)	16,0 (10,0 – 25,5)	9,0 (6,5 – 10,5)
	6	40	0,48 (0,38 - 1,61)	0,70 (0,53 - 1,73)	7,0 (5,0 – 16,0)	9,0 (5,0 -12,0)	16,0 (13,0 – 25,0)	11,0 (9,0 – 25,0)
	9	20	$0,38^{bB}$ (0,22 - 0,54)	$2,10^{A}$ (0,88 - 2,47)	5,0 (3,0 – 7,0)	8,0 (6,0 – 10,0)	21,5 (4,0 – 45,0)	9,0 (7,5 – 14,0)
	9	30	$0,88^{abB}$ (0,48 - 1,01)	$1,80^{A}$ (1,09 - 3,01)	7,0 (5,0 – 13,0)	7,5 (5,0 – 12,0)	13,0 (7,0 – 25,0)	11,0 (7,5 – 16,0)
	9	40	$1,15^{a}$ (0,57 - 1,47)	1,52 (0,87 - 2,05)	7,0 (0 – 16,0)	8,0 (6,0 -11,0)	18,0 (9,0 – 26,0)	8,0 (7,0 – 9,0)
Exposição		**Total**	$0,66^{B}$ (0,32 – 1,29)	$1,41^{A}$ (0,70 – 2,52)	$6,0\ (0 – 16,0)^{B}$	$8,0\ (5,0 – 15,0)^{A}$	$16,0^{A}$ (9,0 – 25,0)	$9,0^{B}$ (7,5- 16,0)
Concentração			0,462	0,811	0,126	0,866	0,29	0,04
Período de exposição			0,043	0,003	0,063	0,003	0,41	0,06
Conc. x Período de exposição			0,220	0,723	0,235	0,835	0,71	0,03

Letras maiúsculas em linha significam diferenças entre as espécies pelo teste de Mann Whitney (p<0,05) e minúsculas, em coluna, significam diferenças, dentro de cada concentração testada, ao longo do período experimental pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05). A significância das relações entre concentração e períodos de exposição foi realizada por meio de análise de variância multivariada. Conc. – Concentração de sal (g/L) à qual os peixes foram expostos.

Histopatologia hepática

Nas análises de fígado foram identificadas sete alterações teciduais (Figura 10).

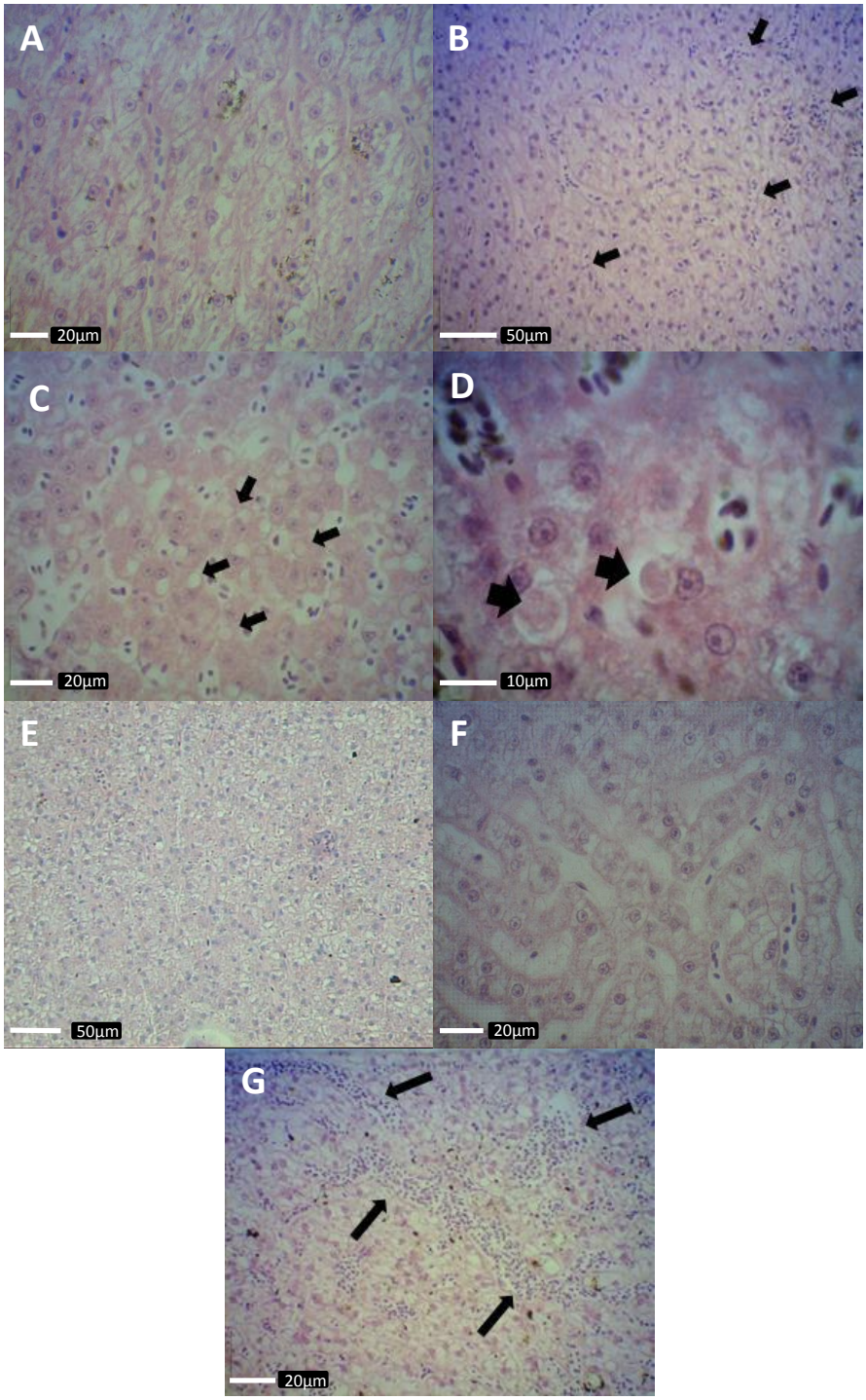


Figura 10. Fotomicrografia de fígado de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* expostos ao sal iodado e corado com HE (hematoxilina e eosina). A) Acúmulo de pigmento; B) Congestão vascular; C) Degeneração macroveseicular; D) Degeneração hialina; E) Degeneração hidrópica; F) Edema e G) Hemorragia.

Nenhuma delas em proporções diferentes entre tratamentos e controle no caso de *M. maculatus*. Já no experimento com *R. quelen*, edema e acúmulo de pigmentos foram prevalentes no controle quando comparados aos animais expostos ao sal, situação que se inverteu em relação à ocorrência de congestão (Tabela 14).

Tabela 14. Frequência (em %) de exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* com alterações hepáticas nos grupos controle e também nos tratamentos expostos ao sal iodado (NaCl). As letras indicam resultados significativamente diferentes ($p<0,05$) entre tratamentos e controle de acordo com teste de proporções realizado.

Alterações	**% de peixes afetados**			
	R. quelen		***M. maculatus***	
	Expostos ao sal	**Controle**	**Expostos ao sal**	**Controle**
	n=81	**n=36**	**n=81**	**n=36**
Acúmulo de pigmentos	31,58[b]	66,67[a]	20,63	29,41
Congestão	47,37[a]	11,11[b]	36,51	23,53
Degeneração gordurosa macrovesicular	3,51	0,00	4,76	5,88
Degeneração hialina	0,00	0,00	4,76	5,88
Degeneração hidrópica	3,51	0,00	0,00	5,88
Edema	3,51[b]	22,22[a]	25,40	11,76
Hemorragia	1,75	0,00	1,59	0,00

Exemplares de *M. maculatus* apresentaram um aumento do IIH e do I_{org} ao longo do período experimental quando expostos a concentração de 3 g/L de sal (Tabela 15).

A comparação dos índices obtidos para ambas as espécies, por sua vez, evidenciou diferenças na exposição a 3 g/L de sal após 40 dias de início do experimento. *M. maculatus* apresentou valores superiores aos de *R. quelen* para os dois índices. Mas, se considerados de forma agrupada todos os tratamentos expostos ao sal e os diferentes períodos de exposição, não houve diferença significativa nos índices de alterações hepáticas entre as duas espécies. Também não houve efeito isolado das concentrações de sal testadas ou do período de exposição sobre os resultados finais obtidos para cada

espécie. Já o cruzamento entre ambos os fatores apresentou efeito significativo ($p<0,05$) nos índices IIHT e I_{org} obtidos para *M. maculatus*.

Tabela 15. Índices de Alterações Hepáticas propostos por Cardoso (2006) (IIHT) e por Bernet, Schmidt et al. (1999) (I_{org}) (p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição ao sal iodado (NaCl) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*.

Tratamento	Conc. (g/L)	Período de exposição (dias)	Espécie			
			R. quelen	***M. maculatus***	***R. quelen***	***M. maculatus***
			IIHT		**I_{org}**	
Controle	0	4	0,11 (0,00 - 0,11)	0	0	0
	0	20	0,06 (0,05 -0,8)	0,01 (0,00 -0,05)	0,02 (0,00 - 0,16)	0
	0	30	5,00 (0,01 - 5,00)	3,87 (0,00 - 5,00)	28,83 (0,00 - 30,00)	25,86 (0,00 - 30,00)
	0	40	0	2,00 (1,14- 3,49)	0	11,95 (6,05 - 21,02)
Exposição	3	20	0,06 (0,04 -0,07)	$0,01^{b}$ (0,00 - 0,06)	0,26 (0,00 - 0,29)	0^{b}
	3	30	1,13 (0,00 - 1,58)	$0,99^{ab}$ (0,06 - 1,07)	5,99 (0,00 - 30,00)	$0,00^{ab}$ (0,00 - 2,02)
	3	40	$0,01^{B}$ (0,00 - 2,75)	$5,00^{aA}$ (4,29 - 5,00)	$0,02^{B}$ (0,00 - 0,29)	$11,95^{aA}$ (6,05 - 21,02)
	6	20	0,65 (0,20 - 4,11)	2,22 (0,00 -5,00)	0,09 (0,00 - 24,00)	0,00 (0,00 - 30,00)
	6	30	0,01 (0,00 - 1,58)	4,09 (0,00 - 5,00)	0,09 (0,00 - 7,51)	24,39 (0,00 - 30,00)
	6	40	0,01 (0,00 - 2,75)	0,04 (0,00 - 0,32)	0,09 (0 -11,95)	0,00 (0,00 - 0,95)
	9	20	4,05 (2,17 - 5,04)	0,02 (0,00 - 5,00)	22,94 (18,04 - 30,00)	0,00 (0,00 - 30,00)
	9	30	2,55 (1,44 - 3,78)	2,50 (0,00 - 5,00)	12,94 (6,12 - 22,02)	15,00 (0,00 - 30,00)
	9	40	3,79 (1,21 - 5,00)	5,00 (2,53 - 5,00)	20,95 (6,04 - 30,00)	30,00 (15,00- 30,00)
Exposição		**Total**	0,96 (0,00 – 5,00)	0,27 (0,00 - 4,05)	0,01 (0,00 – 30,00)	0,01 (0,00 – 22,02)
Concentração			0,141	0,621	0,160	0,525
Período de exposição			0,313	0,110	0,314	0,100
Conc.*Período de exposição			0,394	0,019	0,370	0,040

Letras maiúsculas em linha significam diferenças entre as espécies pelo teste de Mann Whitney (p<0,05) e minúsculas, em coluna, significam diferenças, dentro de cada concentração testada, ao longo do período experimental pelo teste de Kruskal Wallis (p<0,05). A significância das relações entre concentração e períodos de exposição foi realizada por meio de análise de variância multivariada. Conc. – Concentração de sal (g/L) à qual os peixes foram expostos.

Discussão

Apesar das diferenças observadas, os parâmetros de qualidade da água variaram dentro de limites considerados ambientalmente adequadas para a sobrevivência e o bem estar das duas espécies utilizadas no presente estudo (Baldisserotto and Silva 2004).

Na aquicultura, um dos principais usos do sal iodado é como agente antiparasitário (Tonguthai 1997, Miron, Lenise V. F. S et al. 2003). A presença de parasitos em maior frequência em exemplares de *M. maculatus* do grupo controle, quando comparado aos animais expostos ao sal, reforçaria o papel do sal no combate as ectoparasitoses. Essa informação corroboraria ainda a conclusão de Carneiro, Schorer et al. (2005), segundo a qual o uso do sal de cozinha apresenta-se como uma boa alternativa para o controle do ictiofitiriase. Contudo, tal resultado não se repetiu em relação à *R. quelen*. Neste caso, não houve diferença entre tratamentos em relação à prevalência do mesmo parasito (*I. multifiliis*), identificado em alguns exemplares de *R. quelen*. Os resultados mostram que a eficiência antiparasitária do sal não é absoluta, como, aliás, já havia sido constatado em atividades de rotina desenvolvidas em nosso próprio laboratório.

Em relação à toxicologia, tem-se que a sensibilidade dos animais a uma determinada substância de referência é um critério importante na seleção de organismos para ensaios de toxicidade (CANADA 1990, Arenzon, Pinto et al. 2003).

Sabe-se que a tolerância dos peixes a um determinado composto pode variar de acordo com a idade/tamanho dos exemplares utilizados (Marchioro

and Baldisserotto 1999). Ainda assim, os valores de CL_{50} 96h calculados no presente estudo (de 11,4 g**/**L para *R. quelen* e de 10,8 g**/**L para *M. maculatus*), foram bastante próximos aos obtidos em estudos semelhantes reportados na literatura. De acordo com Marchioro (1997), alevinos de *R. quelen* suportam variações de salinidade entre 0 e 10 g**/**L. Em estudo realizado por Marchioro and Baldisserotto (1999) a CL_{50} 96h para juvenis de *R. quelen* foi de 9,1 g/L. Exemplares do catfish *Pylodictis olivari* apresentaram CL_{50} 96h de 10,0 g/L (Bringolf, Kwak et al. 2005), enquanto peixes beta (*Betta splendens*) apresentaram CL_{50} 96h de 11,9 g/L (Zuanon, Salaro et al. 2009).

As alterações brânquias são frequentemente utilizadas como biomarcadores histopatológicos (Winkaler, Silva et al. 2001, Fujimoto, Cruz et al. 2008, Costa, Diniz et al. 2009, Montes, Ferrerira et al. 2010, Santos, Gomes et al. 2011), uma vez que exibem extensas superfícies que estão permanentemente em contato com o ambiente externo. Dentre as alterações teciduais observadas durante este estudo, apenas quatro (congestão, perda de adesão epitelial, edema, fusão de lamelas) apresentaram diferenças de frequência de ocorrência entre os tratamentos. No entanto, nenhuma dessas alterações apresentou repetição no padrão de ocorrência entre as duas espécies analisadas. Além disso, fusão lamelar foi observada em maior frequência no controle do experimento com *M. maculatus*. Assim, apenas as outras três alterações não poderiam ser descartadas como sendo provocadas pela exposição ao sal.

A hiperplasia caracteriza-se pelo aumento do número de células e é provocada pelo aumento na atividade mitótica das células epiteliais localizadas

na base das lamelas e/ou do epitélio respiratório que as reveste (Thomson 1978). As trocas gasosas podem ser prejudicadas quando uma lesão como esta ocorre, pois pode haver um espessamento das lamelas secundárias, provocando sua fusão (Hinton, Baumann et al. 1992). Segundo Heath (1987), a fusão lamelar é um mecanismo natural de defesa para proteger o epitélio da lamela do contato direto dos agentes tóxicos.

A perda de adesão epitelial foi a alteração mais frequentemente observada nas brânquias de ambas as espécies estudadas. Esta alteração caracteriza-se pela separação do epitélio pavimentoso simples de revestimento das lamelas de sua membrana basal, formando áreas com acúmulo de líquido intersticial (Wendelaar Bonga 1997). No edema, por sua vez, ocorre o extravasamento de líquido eosinofílico para o espaço extracelular sub-epitelial. Em ambas as alterações ocorre uma separação física entre o epitélio branquial e sua membrana basal. Esta característica diminui a vulnerabilidade da área superficial das brânquias, mas, por outro lado, pode prejudicar a eficiência das trocas gasosas e do transporte iônico (Winkaler, Silva et al. 2001).

Perda de adesão epitelial, edema, hiperplasia e fusão lamelar são consideradas alterações inespecíficas, que podem ser causadas por uma variedade de agentes estressores (Thophon, Kruatrachue et al. 2003), tais como amônia (Cengiz and Unlu 2006) ou diferentes agrotóxicos (Kumar, Prasad et al. 2010, Al-Ghanbousi, Ba-Omar et al. 2012), podendo ser observadas até mesmo em animais coletados diretamente no ambiente, sem indícios de exposição a tais poluentes (Camargo and Martinez 2007). Segundo Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994), estas lesões podem estar presente em

peixes, independentemente do status da população estuada ou da presença de xenobiontes na água.

A congestão pode ser definida como o acúmulo de sangue em uma determinada região e, de acordo com Thomson (1978), pode ser causada pela existência de um obstáculo físico que impeça o fluxo sanguíneo. Essa alteração foi observada em todos os tratamentos e em ambas as espécies. Entretanto, foi mais prevalente nos exemplares de *R. quelen* expostos ao sal.

Seria esperado, caso os índices histopatológicos avaliados fossem influenciados exclusivamente pela exposição ao sal, que ocorresse um aumento significativo nos índices obtidos após a exposição dos peixes a este produto. Entretanto, isso não ocorreu. De forma complementar, os índices de alteração tecidual não foram significativamente relacionados às concentrações do sal às quais os animais foram expostos, mas apenas ao período de exposição. Da mesma forma, seria razoável supor que houvesse uma possível diminuição de índices de alterações teciduais após a retirada do agente químico e a transferência dos animais para água sem concentrações significativas de sal. Mas, isso também não ocorreu, não sendo observada uma reversão dos índices analisados. Isso pode ser observado principalmente quando usado o índice IIBrT para exemplares de *R. quelen* expostos a 9 g/L de sal. Estes, após 40 dias de experimento, ou seja, 10 dias após a transferência dos animais para água sem concentrações significativas de sal, apresentaram um aumento significativo de valor. A manutenção ou aumento dos índices de alterações teciduais após a transferência para água doce pode ser interpretada como perda da capacidade adaptativa dos animais, como sugerido por Trujillo-

Jiménez, Sedeño-Díaz et al. (2011). Barton (2002), por sua vez, defende a hipótese de que em caso de estresse muito intenso ou persistente, os peixes perderiam a capacidade de recuperação da homeostase. Neste caso, as lesões teciduais observadas e o fato de não terem sido revertidas após o retorno dos animais a um ambiente “normal” poderiam indicar um efeito direto da exposição dos peixes à maior salinidade.

Quando aplicado o IIBrT, observou-se que aos 30 dias de experimento, os índices calculados, em todos os tratamentos, eram superiores para *M. maculatus* em relação a *R. quelen.* O mesmo foi observado quando utilizados o I_{org} e o IIBrT para os dados agrupados. Quando usado o IAH, entretanto, os valores obtidos para *R. quelen* foram superiores. Esses resultados poderiam, a primeira vista, sugerir uma relação espécie-específica entre as alterações histopatológicas branquiais e a exposição dos peixes ao sal. Entretanto, essas diferenças podem também estar sendo causadas pelas diferentes abordagens de cada índice visto. Os resultados foram similares quando aplicados o I_{org} e o IIBrT, que consideram o tamanho das lesões e a relação entre lamelas alteradas e o número total de lamelas analisadas. Já o IAH, que apresentou resultado divergente dos demais, não considera o tamanho das lesões.

O período de exposição apresentou influência quando da aplicação do I_{org} e do IIBRT calculados para *M. maculatus* e do IIBRT calculado para *R. quelen*, enquanto que as concentrações de sal testadas apresentaram efeito significativo apenas para o índice IAH calculado para *M. maculatus*. Novamente podem ser observadas as diferenças apresentadas pelos índices utilizados. O uso desses três índices foi realizado esperando-se ser possível observar um

efeito dose-resposta das brânquias em relação ao sal, entretanto isso não foi observado.

O fígado, por sua vez, desempenha papel chave no metabolismo e na excreção de xenobióticos (Bernet, Schmidt et al. 1999). Suas funções incluem a assimilação de nutrientes, a produção de bile e a desintoxicação do organismo (Genten et al., 2009). De acordo com Mela, Randi et al. (2007), há uma relação de causa e efeito entre a exposição a poluentes e o desenvolvimento de lesões hepáticas.

Entre as alterações teciduais observadas no fígado três alterações apresentaram diferenças entre tratamentos e controles, acúmulo de pigmentos, edema e congestão. Destas, edema e acúmulo de pigmentos foram mais prevalentes no controle que nos tratamentos expostos ao sal. Apenas congestão em *R. quelen* foi mais prevalentes no tratamento de exposição quando comparado ao controle.

O edema é causado pelo acúmulo anormal de líquido nos espaços extracelulares, podendo ser ocasionado por inúmeros fatores (Thomson (1978). Os pigmentos observados no fígado foram caracterizados como grânulos amarelo-amarronzados, que também podem ser originados por falha do metabolismo ou da excreção de pigmentos biliares (Meletti et al., 2008).

A congestão hepática, assim como a congestão branquial, ocorre devido à obstrução ao fluxo sanguíneo, ocasionando estase sanguínea. Pode ser provocada por obstrução física de pequenos ou de grandes vasos ou pela falha do fluxo normal de sangue (Thomsom 1983). Esta alteração foi observada com maior prevalência em exemplares de *R. quelen* expostos ao sal que nos

animais do controle, assim como havia sido observado nas brânquias. Duas hipóteses poderiam explicar a ocorrência da congestão, neste caso: 1) uma eventual cristalização do sal no interior dos vasos em ambos os órgãos avaliados; 2) um eventual desequilíbrio hidroeletrolítico, que teria levado à alteração da permeabilidade das membranas, gerando rompimento celular, formação de êmbolos e trombos e, por fim, obstruindo os vasos sanguíneos e gerando a congestão. Nos cortes histológicos analisados, entretanto, não foram observadas a cristalização ou a formação de trombos. Ainda assim, sua ocorrência não pode ser completamente refutada, pois estes poderiam estar presentes em outros fragmentos do tecido que não foram analisados.

Assim, dentre as alterações observadas, apenas a congestão, identificada especificamente nos exemplares de *R. quelen,* não poderia ser descartada como tendo sido causada pela exposição dos peixes ao sal. Por outro lado, há que se ressaltar que nem a concentração de sal e tampouco o período de exposição dos peixes ao sal apresentaram relação estatisticamente significativa com os índices de alterações teciduais obtidos.

Quando realizado o uso de sal em exemplares de *R. quelen* e *M. maculatus,* há evidências suficientes para se afirmar que nenhuma das alterações histopatológicas observadas no fígado dos animais analisados pode ser correlacionada à sua exposição ao sal. Por outro lado, há evidências de que o sal provoca alterações teciduais que podem ser identificadas e quantificadas nas brânquias, com destaque para perda de adesão epitelial, edema e congestão.

Referências

ABNT (2004). "ABNT NBR 15088:04 (Brazilian Association of Technical Standards), Aquatic Ecotoxicology) - Acute toxicity - Test method with fish." 19.

Agamy, E. (2013). "Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study." Marine Environmental Research **86**: 46-55.

Al-Ghanbousi, R., T. Ba-Omar and R. Victor (2012). "Effect of deltamethrin on the gills of Aphanius dispar : a microscopic study." Tissue cell **44**: 7-14.

Altinok, I. and J. M. Grizzle (2003). "Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish." World Aquac. Soc **34**(1): 113-117.

Anderson, D. P. (1992). "Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture." Annual Review of Fish Diseases **2**(0): 281-307.

Arenzon, A., R. F. Pinto, P. Colombo and M. T. Raya-Rodriguez (2003). "Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(9): 2188–2190.

Baldisserotto, B. and L. V. F. Silva (2004). The quality of the water. In: Bernardo Baldisserotto; João Radünz Neto. (Org.). Criation of "jundiá".

Barton, A. B. (2002). "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids." Integrative and Comparative Biology(42): 513-525.

Barton, B. A. and R. E. Zitzow. (1995). "hysiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water." Progressive Fish-Culturist **57**: 267–276.

Beçak, W. and J. Paulete (1976). Técnicas de citologia e histologia.

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic poluttion." Journal of fish disease **22**(25-34).

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic poluttion." Journal of fish disease **22**: 25-34.

Bringolf, R. B., T. J. Kwak, W. G. Cope and M. S. Larimore (2005). "Salinity tolerance of flathead catfish: implications for dispersal of introduced population." Transactions of the American Fisheries Society **134**: 927-936.

Camargo, M. M. P. and C. B. R. Martinez (2007). "Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream." Neotropical Ichthyology, **5**(3): 327-336.

CANADA, E. (1990). Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. E.P.S. 1/RM/12.

Cardoso, M. F. (2006). Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais. Mestrado, Universidade Federal do Paraná.

Cardoso, M. F. (2006). Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais. i. d. P.-G. e. C. V.-U. F. d. Paraná.
Carneiro, P. C. F., M. Schorer and J. D. Mikos (2005). "Conventional therapeutic treatments in controlling ectoparasites *Ichthyophtirius multifiliis* in jundiá (*Rhamdia quelen*)." Pesquisa Agropecuária Brasileira **40**: 99-102.
Cengiz, E. I. and E. Unlu (2006). "Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin." Environmental Toxicology and Pharmacology **22**: 200–204.
CETESB (1990). "Companhia de Tecnologia e Saniamento Ambiental - Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes liquídos.".
Costa, P. M., M. S. Diniz, S. Caeiro, J. Lobo, M. Martins, A. M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T. A. Delvassa and E. Costa (2009). "Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach." Aquatic Toxicology **92**: 202–212.
Cruz, C., P. Cubo, G. R. Gomes, F. P. Venturini, P. E. Guilherme and R. A. Pitelli (2008). "Sensibilidade de Peixes Neotropicais ao Dicromato de Potássio." J. Braz. Soc. Ecotoxicol **13**(1): 53-55.
Ferraz de lima, C. L. B., N. S. Reis and P. S. Ceccarelli (1991). "Histological characterization of ichthyophthiriasis in pacu, Piractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae)." Boletim Técnico CEPTA **4**(8).
Fujimoto, R. Y., C. Cruz and F. R. Moraes (2008). "Analysis of effluent and histology of the skin, liver and kidney pacu (*Piaractus mesopotamicus*) supplemented with trivalent chromium." Boletim do Instituto da Pesca **34**(1): 117-124.
Gagnon, M. M. and P. V. Hodson (2012). "Field studies using fish biomarkers – How many fish are enough?" Marine Pollution Bulletin **64**(12): 2871-2876.
Galvan, G. L. (2015). Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores. Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
Garcia, L. O., A. G. Becker, C. E. Copatti, B. Baldisserotto and J. Radünz Neto (2007). "Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings." Journal of the World Aquaculture Society **38**: 1-11.
He, J., L. Fu, Y. Wang, J. J. Li, X. H. Wang, L. M. Su, L. X. Sheng and Y. H. Zhao (2014). "Investigation on baseline toxicity to rats based on aliphatic compounds and comparison with toxicity to fish: Effect of exposure routes on toxicity." Regulatory Toxicology and Pharmacology **70**(1): 98-106.
Heath, A. G. (1987). Water Pollution and Fish Physiology. Florida -USA.
Hinton, D. E., P. C. Baumann, G. R. Gardner, W. E. Hawkins, J. D. Hendricks, R. A. Murchelano and M. S. Okihiro (1992). Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.
Hoffmann, S., A. Kinsner-Ovaskainen, P. Prieto, I. Mangelsdorf, C. Bieler and T. Cole (2010). "Acute oral toxicity: Variability, reliability, relevance and interspecies comparison of rodent LD50 data from literature surveyed for the ACuteTox project." Regulatory Toxicology and Pharmacology **58**(3): 395-407.
Horobin, R. W. and J. D. Brancoft (1998). Troubleshooting histology stains.

Hunt, J. W. and B. S. Anderson (1989). "Sublethal effects of zinc and municipal effluents on larvae of the red abalone Haliotis rufescens." Marine Biology **101**(4): 545-552.
Jorge, R. A. D. L. V. C. and G. S. Moreira (2005). "Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel Perna perna (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia)." Ecotoxicology and Environmental Safety **61**(2): 280-285.
Kumar, A., M. R. Prasad, K. Srivastava, S. Tripathi and A. K. Srivastav (2010). "Branchial histopathological study of catfish Heteropneustes fossilis following exposure to purified neem extract , Azadirachtin." World journal of zoology **5**(4): 239-243.
Livingstone, D. R. (1993). "Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment." Journal of chemical technology and biotecnology **57**: 195-211.
Luz, R. K., R. M. Martínez-Álvarez, N. Pedro and D. M. J. Delgado (2008). "Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities." Aquaculture **276**(0): 171 178.
Maceina, M. J., F. G. Nordlie and J. V. Shireman (1980). "The influence of salinity on oxygen consumption and plasma electrolytes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* " Jpurnal of fish biology **16**(6): 613-619.
Marchioro, M. I. (1997). Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) à variação de pH e salinidade da água de cultivo., Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
Marchioro, M. I. and B. Baldisserotto (1999). "Fry survival Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) to changes in water salinity." Ciência Rural **9**(0): 315-318.
Mela, M., I. C. Guiloski, H. B. Doria, M. A. F. Randi, C. A. O. Ribeiro, L. Pereira, A. C. Maraschi, V. Prodocimo, C. A. Freire and H. C. Silva de Assis (2013). "Effects of the herbicide atrazinein neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)." Ecotoxicology and environmental safety(93): 13-21.
Mela, M., M. A. Randi, D. F. Ventura, C. E. Carvalho, E. Pelletier and C. A. O. Ribeiro (2007). "Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*." Ecotoxicoligal and environmental safety **68**: 426–435.
Melancon, M. J. (1995). Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Jr.; Cairns, J., and Jr. editors. Handbook of ecotoxicology.
Miller, E. R. and C. B. Ammerman (1995). 8 - Iodine bioavailability. Bioavailability of Nutrients for Animals. C. B. A. H. B. J. Lewis. San Diego, Academic Press**:** 157-167.
Miron, D. S., Lenise V. F. S , J. I. Golombieski and B. Baldisserotto (2003). "Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis*-Infected Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings." Journal of Applied Aquaculture **14**(1-2): 155-161.
Miron, D. S., B. Moraes, B. A. G., M. Crestani, R. Spanevello, V. Loro and B. Baldisserotto (2008). "Ammonia and pH effects on some metabolic parameters

and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae)." Aquaculture **277**: 192-196.
Montes, C. S., M. A. P. Ferrerira, S. S. D. Santos, E. I. C. F. Von Ledebur and R. Rocha (2010). "Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará state, Brazil." Acta Scientiarum Biological Sciences **32**(1): 93-99.
Muñoz, L., P. Weber, V. Dressler, B. Baldisserotto and F. A. Vigliano (2015). "Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to a sublethal lead concentration." Ecotoxicology and Environmental Safety **113**(0): 241-247.
Ong, E. S. and Z. B. Din (2001). "Cadmium, Copper, and Zinc Toxicity to the Clam, Donax faba C., and the Blood Cockle, Anadara granosa L." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **66**(1): 86-93.
Oyoo-Okoth, E., L. Cherop, C. C. Ngugi, V. Chepkirui-Boit, D. Manguya-Lusega, J. Ani-Sabwa and H. Charo-Karisa (2011). "Survival and physiological response of Labeo victorianus (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient." Aquaculture **319**(1–2): 226-231.
Poleksic, V. and V. Mitrovic-Tutundzic (1994). Fish gills as a monitor of sublethalc and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Oxford, Fishing News Books.
Resgalla Jr., C. and K. S. Laitano (2002). "Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no brasil." Notas Técnicas da Facimar **6**(153-163).
Salazar-Lugo, R., C. Mata, A. Oliveros, L. M. Rojas, M. Lemus and E. Rojas-Villarroel (2011). "Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures." Environmental Toxicology and Pharmacology **31**: 490-495.
Santos, T. C. A., V. Gomes, M. J. A. C. R. Passos, A. J. S. Rocha, R. B. Salaroli and P. V. Ngan (2011). "Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene." Pan-American Journal of Aquatic Sciences **6**(2): 109-120.
Tacchi, L., L. Lowrey, R. Musharrafieh, K. Crossey, E. T. Larragoite and I. Salinas (2015). "Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)." Aquaculture **435**(0): 120-127.
Thomsom, R. G. (1983). Patologia geral veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
Thomson, R. G. (1978). Patologia geral veterinária.
Thophon, S., M. Kruatrachue, E. S. Upatham, P. Pokethitiyook, S. Sahaphong and S. Jaritkuan (2003). "Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. ." Environmental pollution. **121**: 307-320.
Tonguthai, K. (1997). "Control of freshwater fish parasites: a Southeast Asian perspective." International Journal for Parasitology **27**(10): 1185-1191.

Trujillo-Jiménez, P., J. E. Sedeño-Díaz, J. A. Camargo and E. López-López (2011). "Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). ." Ecological Indicators **11**: 1636-1646.

USEPA (2002). Methods for mensuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5ª ed.

Wang, J.-Q., H. Lui, H. Po and L. Fan (1997). "Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings." Aquaculture **148**(2-3): 115-124.

Wangen, K. B. S. (2012). "Therapeutic review: sodium chloride." Journal of Exotic Pet Medicine **21**: 94-98.

Wendelaar Bonga, S. E. (1997). "The stress response in fish." Physiological Reviews **77**(3): 591-625.

Winkaler, E. U., A. G. Silva, H. C. Galindo and C. B. R. Martinez (2001). "Histological and physiological biomarkers to monitor the health of streams of fish Londrina, Paraná State." Acta Scientiarum **3**(2): 507-514.

Wurts, W. A. and R. M. Durborow (1992). "Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds." Southern Regional Aquaculture Center **464**: 1-4.

Zuanon, Z. A. S., A. L. Salaro, G. C. Veras, M. M. Tavares and W. Chaves (2009). "Tolerância aguda e crônica de adultos de beta, *Betta splendens* , à salinidade da água." Revista brasileira de zootecnia **38**(11): 2106-2110.

Capítulo 4. Efeitos da amônia nas estruturas teciduais branquial e hepática de jundiás (Rhamdia quelen) e de pacus (Metynnis maculatus)

Resumo

A amônia é considerada um dos principais poluentes que afetam os ecossistemas aquáticos continentais. A histopatologia, por sua vez, é utilizada como ferramenta em estudos de diagnóstico de impactos ambientais. O objetivo do presente trabalho foi testar a sensibilidade de exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* à amônia e avaliar, por meio do uso de índices quantitativos, as respostas histopatológicas branquiais e hepáticas derivadas da exposição dos peixes a este composto. Foram realizados dois experimentos. No primeiro, os peixes foram expostos a diferentes concentrações de amônia, por 96 horas, para cálculo da CL_{50}. No segundo, foi realizada a exposição subcrônica (40 dias) dos animais à amônia. As brânquias e o fígado dos animais utilizados no experimento subcrônico foram submetidos ao processamento histológico de rotina e analisados em microscópio óptico. A CL_{50}, após 96 horas de exposição, foi de 140,6 mg/L de nitrogênio na forma de amônia total (N-AT) para *R. quelen* e de 112,4 mg/L de N-AT para *M. maculatus*. A toxicidade da amônia não ionizada (NH_3) para *R. quelen* foi calculada em 0,94 mg/L de N-NH_3 e para *M. maculatus* em 0,71 mg/L de N-NH_3. Embora 13 alterações histopatológicas branquiais tenham sido identificadas, os resultados obtidos indicaram que apenas congestão, em *R. quelen*, e hiperplasia epitelial, em *M. maculatus*, apresentaram uma relação do tipo dose/efeito com a amônia. Já na análise hepática, nenhuma das cinco alterações histopatológicas identificadas foi relacionada com a exposição à amônia. Os resultados obtidos ressaltam a importância do uso de indicadores quantitativos na histopatologia e evidenciam que diferentes espécies de peixes podem responder de maneiras distintas à exposição à amônia.

Palavras chave: alterações teciduais, biomarcador, índice de Bernet, índice de Cardoso.

Abstract

Ammonia is considered one of the main pollutants affecting freshwater ecosystems. Histopathology, in turn, is used as a diagnostic tool in studies of environmental impact. The objective of this study was to test the sensitivity of copies of *Rhamdia quelen* and *Metynnis maculatus* to ammonia and evaluate, through the use of quantitative indices, the gill and liver histopathological

answers derived from the exposure of fish to this compound. Two experiments were conducted. At first, the fish were exposed to different concentrations of ammonia, for 96 hours, to calculate the LC50. Then, the subchronic exposure (40 days) the animals was performed to ammonia. The gills and liver of animals used in subchronic experiment were submitted to routine histological processing and examined under an optical microscope. The LC50 after 96 hours of exposure was 140.6 mg / L of nitrogen in the form of total ammonia (TA-N) for A. quelen and 112.4 mg / L of N-AT *M. maculatus*. The toxicity of un-ionized ammonia (NH3) to *R. quelen* was calculated as 0.94 mg / L NH3-N and *M. maculatus* in 0.71 mg / L NH3-N. Although 13 gill histopathological changes have been identified, the results indicated that only congestion in *R. quelen*, and epithelial hyperplasia in *M. maculatus* showed a relationship type of dose / effect with ammonia. In the liver test, none of the five identified histopathological changes were related to the exposure to ammonia. The results underscore the importance of using quantitative indicators on histopathology and show that different species of fish may respond in different ways to exposure to ammonia.

Introdução

A amônia é o principal produto final do catabolismo proteico de peixes (Diricx, Sinha et al. 2013). Também é um composto frequentemente encontrado em efluentes industriais e agrícolas, podendo ainda ser gerada naturalmente pelo processo de decomposição da matéria orgânica (Keluskar, Nerurkar et al. 2013). Por essa diversidade de fontes, a amônia é considerada um dos principais poluentes nos ecossistemas aquáticos continentais (Cheng, Yang et al. 2015).

Em meio aquoso, a amônia é encontrada em duas formas químicas: a ionizada (NH_4^+) e a não-ionizada ou não ionizada (NH_3). A soma destas duas formas é denominada amônia total (AT= NH_3 + NH_4^+) (Thurston and Russo 1983). Tanto o NH_4^+ quanto o NH_3, são tóxicos para os peixes, porém o NH_3 apresenta maior toxicidade em função da sua capacidade de se difundir através das membranas branquiais, graças à ausência de carga elétrica e à sua solubilidade lipídica. Já a forma iônica é usualmente hidratada e não

consegue se difundir através dos microporos hidrofóbicos das membranas branquiais (Benli, Köksal et al. 2008).

Dentre as consequências da exposição de peixes à amônia, estão o aumento do conteúdo de água e de ácido lático e a redução dos níveis de açúcar, ATP e de NADH no cérebro dos animais (Arillo, Margiocco et al. 1981, Wilkie, Stecyk et al. 2015); alterações do equilíbrio de Na^+ e K^+ e despolarização neuronal (Randall and Tsui 2002); alterações da osmolalidade plasmática e de parâmetros hematológicos (Knoph and Thorud 1996); dificuldade de excreção, levando a um aumento do nível de amônia no sangue e nos tecidos e causando danos fisiológicos severos (Boyd and Tucker 1998); e danos ao epitélio branquial, com o consequente aumento de dificuldade na realização de trocas gasosas (Durborow, D.M. et al. 1997).

A histopatologia, por sua vez, é amplamente utilizada como ferramenta para o diagnóstico de impactos ambientais em função da posição intermediária que o estudo de lesões histológicas ocupa no espectro de complexidade biológica proposto por Heath (1995). Os extremos dessa complexidade seriam a função gênica, atividades enzimáticas e permeabilidade de membranas, de um lado, e a ecologia e o comportamento de outro. A análise das lesões teciduais pode permitir ainda a identificação de alterações relacionadas à dose/concentração de um determinado agente tóxico/patogênico ao qual os animais foram expostos (Teh, Adams et al. 1997, Boran, Capkin et al. 2012).

Em peixes, a histopatologia é focada principalmente em órgãos responsáveis pelo metabolismo de substâncias tóxicas, como o fígado (Arellano, Storch et al. 1999, Fanta, Rios et al. 2003), e em órgãos que

desempenham papel na manutenção osmótica e iônica, como as brânquias, por exemplo (Lupi, Nhacarini et al. 2007). A escolha das brânquias nesse tipo de estudo também se justifica por estarem diretamente expostas aos agentes e substâncias tóxicas presentes na água e pelo fato da morfologia branquial ser plástica em muitas espécies de peixes, havendo alteração da sua área superficial em resposta a perturbações ambientais (Wright and Wood 2012).

O objetivo do presente estudo foi testar a sensibilidade de exemplares de *Rhamdia quelen* e de *Metynnis maculatus* à amônia e avaliar as respostas histopatológicas branquiais e hepáticas derivadas da exposição dos animais a este composto.

Material e Métodos

Obtenção e acondicionamento dos exemplares

Peixes, adquiridos na Central de Abastecimento do Paraná S/A (Ceasa), em Curitiba, PR, Brasil, foram transportados em sacos plásticos (contendo 1/3 de água e 2/3 de oxigênio) até o Laboratório de Pesquisa com Organismos Aquáticos (LAPOA), do Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA), da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Chegando ao laboratório, passaram pela aclimatação lenta e gradual às condições ambientais utilizadas no laboratório (temperatura de 25 ± 1 °C e pH 7,2). Posteriormente, receberam um banho de sal (6 g/L) por duas horas, como tratamento profilático a parasitoses e doenças bacterianas. Após o banho, os peixes foram transferidos para tanque de polietileno (1.000L), sob aeração constante (oxigênio dissolvido

6,0 ± 1 mg/L) e temperatura controlada (25 ± 1 °C). Durante a aclimatação, os peixes foram alimentados *ad libitum,* duas vezes ao dia, com ração comercial extrusada contendo 47% de proteína bruta.

Testes de toxicidade

A água utilizada nos experimentos era oriunda da rede de abastecimento público e foi mantida em tanques de 500L de polietileno, clorada (0,2 mL NaClO/L água) e mantida sob aeração intensa. Após a completa evaporação do cloro residual, a água era acondicionada em tanques de polietileno de 1.000L contendo filtro biológico interno (pedra brita, manta acrílica, areia e conchas de ostras), sob aeração constante (oxigênio dissolvido 6,0 ± 1mg/L) e temperatura controlada (25 ± 1 °C), até sua utilização nos experimentos.

Foram realizados experimentos independentes, envolvendo separadamente exemplares de cada espécie: experimento de exposição aguda (duração de 96h) e experimento de exposição subcrônica (duração de 40 dias) à amônia.

Experimento piloto

Para determinar as concentrações a serem utilizadas no experimento agudo, peixes foram acondicionados em aquários de 10L na densidade de 5 peixes/aquário. Estes foram submetidos, por 96h, sob aeração e temperatura controladas, fotoperíodo 12L /12E, a nove concentrações de amônia (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 e 500 mg/L).

Teste de referência

Antes do início de cada experimento, peixes dos lotes já aclimatados foram submetidos a um teste de sensibilidade utilizando o sal iodado (sal de cozinha) como substância de referência, seguido a metodologia e os padrões referenciais propostos por Zeni et al. (capítulo 3). A CL_{50} (96h) do sal iodado para *R. quelen* foi de 11,4 g/L e a de *M. maculatus* foi de 11,0 g/L. Como esses valores encontravam-se dentro dos limites estabelecidos para ambas as espécies, os lotes foram considerados aptos a serem utilizado nos testes de toxicidade com amônia.

Experimento agudo

As concentrações utilizadas no experimento agudo foram baseadas nos resultados obtidos no experimento piloto. Os peixes então expostos a concentrações abaixo de 100 mg/L deixavam de se alimentar, mas não morreram durante as 96 h. Todos os peixes expostos a concentrações superiores a 250 mg/L, por sua vez, morreram. Baseado nesses resultados, durante o experimento agudo os peixes foram expostos a seis concentrações de N-AT (80, 100, 150, 200, 250 e 300 mg/L) e um tratamento controle (seguindo metodologia adaptada da EPA, 2002).

Os experimentos foram realizados em tanques de polietileno (40L), com temperatura controlada (25 ± 1°C), aeração constante (oxigênio dissolvido em 6,0 ± 1 mg/L) e fotoperíodo controlado (12L/12E). Os indivíduos (n=7) (*R. quelen:* 14,3 ± 1,97 g e *M. maculatus:* 12,98 ± 2,99 g) foram mantidos nesses tanques por 96 h para aclimatação às condições laboratoriais (Agamy 2013).

Após este período, a amônia na forma de cloreto de amônio (NH_4Cl), foi dissolvida e adicionada às unidades experimentais nas devidas concentrações.

Durante os experimentos, a análise e o registro dos parâmetros de qualidade da água foram realizadas a cada 24h. A temperatura e a concentração de oxigênio dissolvido foram medidas com um oxímetro portátil (YSI 550A, USA). O pH foi medido com pHmetro de bancada (AZ86505, Brasil). A amônia total (N-AT = NH_3+NH_4^+) foi analisada por meio de espectrofotometria, de acordo com a metodologia descrita por Baptista et al. (1987). O cálculo das concentrações de amônia não ionizada ($N\text{-}NH_3$) foi realizado segundo metodologia descrita por Ostrensky, Marchiori et al. (1992).

A CL_{50} foi determinada em relação ao N-AT e ao $N\text{-}NH_3$, a partir do número de indivíduos mortos durante diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 horas), utilizando-se o Software LC_{50} Programs JSpearman Test.

Experimento subcrônico

No experimento subcrônico os indivíduos (*R. quelen:* 15,8 ± 2,24 g e *M. maculatus:* 14,5 ± 2,06 g) foram acondicionados em tanques de polietileno (80 L), em condições idênticas às do experimento agudo. Após o período de aclimatação de 96 h, os peixes foram submetidos às diferentes concentrações de amônia dissolvida na água (20, 50 e 80 mgL), além do controle. Todos os tratamentos foram testados em triplicata. Logo após encerrado o período de 96h de aclimatação, peixes de um tanque adicional (n= 15) foram submetidos à eutanásia e destinados à histopatologia por microscopia de luz, com o objetivo

avaliar as eventuais alterações teciduais presentes antes mesmo do início do experimento.

O registro dos parâmetros de qualidade da água foi realizado a cada 48h, seguindo a metodologia descrita para o experimento agudo. Durante todo período experimental, os peixes foram alimentados uma vez ao dia. A ração ficava disponível por 10 minutos, sendo retirada após este período. Após a análise de água, 50% do volume de água dos tanques era renovado. No 30º dia as concentrações de amônia adicionadas aos tanques foram reduzidas pela metade e no 31º dia foi reduzida a zero, iniciando assim o período de manutenção dos animais em água isenta de concentrações significativas de amônia, assim permanecendo até o 40º dia, quando o experimento foi encerrado.

Análise histológica

Os 15 peixes coletados inicialmente e mais cinco indivíduos de cada tanque, retirados 20, 30 e 40 dias após o início do experimento, foram anestesiados com óleo de cravo (35 µL/L), submetidos à insensibilização por secção medular e à eutanásia por hipovolemia. Após constatada a morte, os animais eram medidos (comprimento total e comprimento padrão, com paquímetro, Vonder, Brasil) e pesados (peso total medido com balança Sartorius analytic, Alemanha). A seguir, eram fixados em ALFAC por 48 horas (Mela, Guiloski et al. 2013), sendo posteriormente coletados um arco branquial e um fragmento de fígado, os quais eram submetidos ao processamento histológico de rotina (Beçak and Paulete 1976). As peças eram seccionadas

em micrótomo rotativo (5 µm de espessura) e coradas em hematoxilina de Harris e eosina (HE) (Horobin and Brancoft 1998).

As lâminas foram analisadas utilizando microscópio de contraste de fase Olympus BX41 (Japão) e o software Dino® (2012). Foram analisadas as brânquias de todos os peixes e o fígado de três animais por tanque, da cada concentração (n=9 por tratamento), a cada período experimental. Para identificação das alterações teciduais as lâminas permanentes foi usado aumento de 40X. Para confirmação de pequenas alterações era necessário usar aumento de 100X com óleo de imersão.

A análise branquial foi realizada em lamelas de cinco filamentos. Para a análise de fígado foram capturadas aleatoriamente e analisadas sob microscópio óptico, imagens de cinco campos em um corte histológico, com aumento de 400 vezes. As análises foram realizadas utilizando-se três índices de impacto.

O Índice do Órgão (I_{org}), proposto por Bernet, Schmidt et al. (1999), foi calculado pela fórmula a seguir:

$$\mathrm{Iorg} = \sum_{rp} \sum_{alt} (\alpha \text{ or rp alt x } w \text{ or rp alt})$$

Onde: org (órgão); alt (alteração); rp (padrão de reação); α (extensão da lesão); w (relevância patológica da alteração).

O Índice de Impacto Branquial, proposto por Cardoso (2006) foi calculado a partir da relação entre lamelas alteradas e lamelas analisadas:

$$IIBR = (N_1/N_2).$$

Onde: IIBR = Índice de Impacto Branquial, N_1= n° de lamelas alteradas e N_2= n° de lamelas analisadas.

Por fim, através do somatório dos IIBR era calculado o Índice de Impacto Branquial Total:

$$\mathrm{IIBRT} = \sum_{i=1}^{5} \mathrm{IIBR_n}$$

Onde: IIBRT = Índice de Impacto Branquial total; $IIBR_n$ - Índice de Impacto Branquial da lamela n.

O Índice de Impacto Hepático, proposto por Cardoso (2006) foi calculado a partir da relação entre a área tecidual alterada e a área total analisada:

$$IIH = (A_1/A_2).$$

Onde: IIBR = Índice de Impacto Hepático, A_1= área alterada e A_2= área analisada.

Por fim, através do somatório dos IIH era calculado o Índice de Impacto HepáticoTotal:

$$\mathrm{IIHT} = \sum_{i=1}^{5} \mathrm{IIH_n}$$

Onde: IIHT = Índice de Impacto Hepático total; IIH_n - Índice de Impacto hepático da área n.

Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) classificam as alterações branquiais em três estágios, segundo o comprometimento das funções das

brânquias. Estágio I: as alterações não comprometem o funcionamento das brânquias, estágio II: a alteração prejudica o funcionamento normal das brânquias e o estágio III considera alterações severas e irreversíveis. A partir desta classificação é realizado o cálculo do Índice de Alteração Histopatológica (IAH), que é calculado para cada animal utilizando a fórmula:

$$IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$$

Onde: I, II e III correspondentes ao número de alterações de estádio I, II e III.

O valor médio de IAH é classificado em cinco categorias de danos. O primeiro (0-10) considera o funcionamento normal do tecido e o último (superior a 100) considera que o dano causado às brânquias é irreversível.

Análises estatísticas

Os dados obtidos através da aplicação dos índices de alteração teciduais foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Os resultados das análises branquiais e hepáticas obtidos em diferentes concentrações e em diferentes períodos de exposição foram analisados por meio do teste de *Kruskal-Wallis*. As comparações entre os resultados obtidos para as duas espécies analisadas foram realizadas utilizando-se o teste de *Mann Whitney*. As alterações teciduais específicas observadas nos tratamentos expostos à amônia em relação ao seu controle foram analisadas utilizando-se o teste de proporções. Todos os testes estatísticos foram realizados com uso do software Statistica 8.0®, com significância de 95%.

Resultados

Parâmetros de qualidade de água

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) em relação às variáveis de qualidade da água medidas nos tratamentos em relação ao seu respectivo grupo controle. A temperatura dos aquários foi mantida em 25 ± 1^{o}C em e a concentração de oxigênio dissolvido em 6,5 ± 1,0 mg/L. O pH apresentou mediana variando de 6,94 a 7,11.

Exposição aguda

Durante o experimento de exposição aguda (CL_{50}) observou-se que os animais expostos a concentrações superiores a 100 mg*/*L de N-AT não se alimentavam desde o primeiro dia de experimentação. Nenhum animal do tratamento controle morreu durante o experimento.

A CL_{50} (96h) de N-AT calculada para os juvenis de *R. quelen* foi de 140,6 mg*/*L, enquanto para *M. maculatus* foi de 112,4 mg/L. A curva de toxicidade obtida para *R. quelen* estabilizou-se após 48h de exposição, enquanto para exemplares de *M. maculatus* a estabilização ocorreu após 72 h (Figura 11).

A toxicidade dos peixes à amônia não ionizada, por sua vez, variou de 1,42 a 0,94 mg/L de N-NH_3 entre 24 e 96 horas para exemplares *de R. quelen* e de 1,34 a 0,71 mg/L de N-NH_3 para *M. maculatus* (Figura 11).

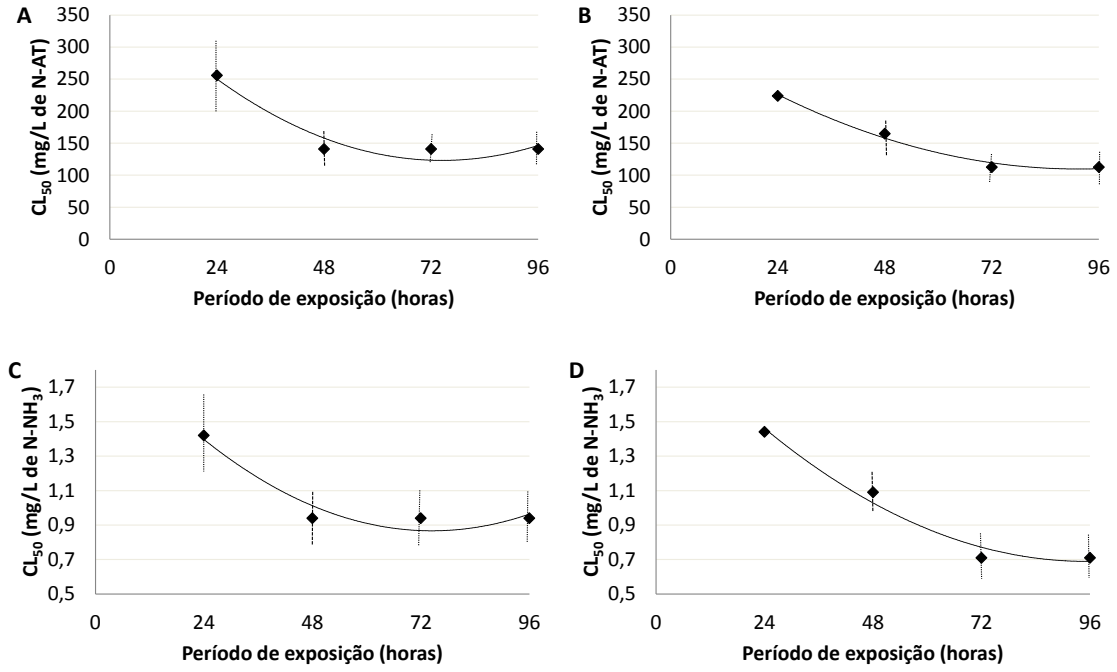


Figura 11. Variação da $CL_{50,}$ e seus respectivos intervalos de confiança da (A e B) amônia total (mg/L de N-AT) e (C e D) amônia não ionizada (mg/L de N-NH_3) para *Rhamdia quelen* (esquerda) e *Metynnis maculatus* (direita).

Exposição subcrônica

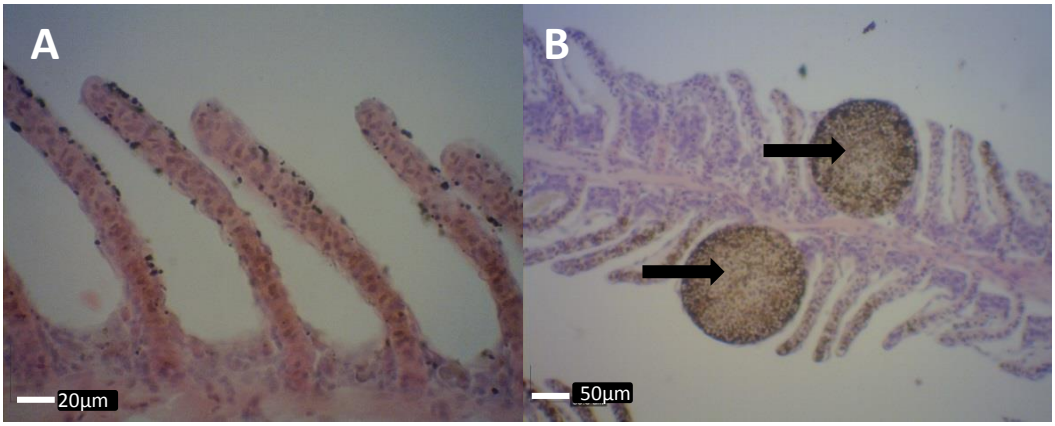
Parâmetros de qualidade de água

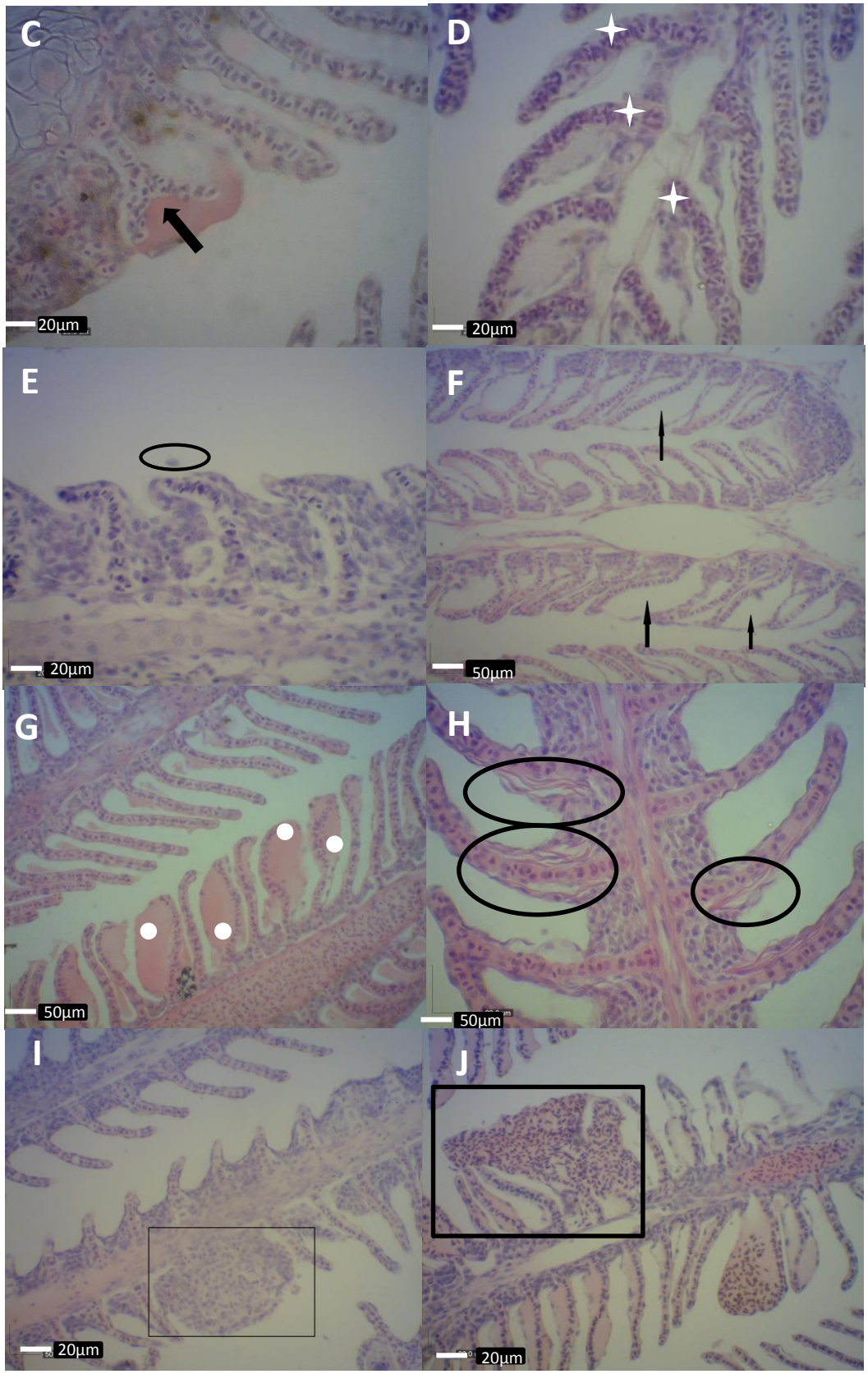
Não foram observadas diferenças significativas (p>0,05) em relação às variáveis de qualidade da água (temperatura, oxigênio e pH) quando comparados os tratamentos de exposição em relação ao tratamento controle.

Para *R. quelen* a temperatura dos aquários teve mediana de 25, 5 ^{o}C, a concentração de oxigênio dissolvido mediana de 6,7 e o pH apresentou mediana variando de 6,91 a 7,17. Para *M. maculatus* a temperatura mediana ficou em 25, 4 ^{o}C, a concentração de oxigênio dissolvido mediana de 6,4 e o pH apresentou mediana variando de 6,4 a 7,1.

Histologia branquial

Nas brânquias dos peixes expostos subcronicamente à amônia foram registradas 13 lesões teciduais (Figura 12).




C
20µm
D
20µm
E
20µm
F
50µm
G
50µm
H
50µm
I
20µm
J
20µm

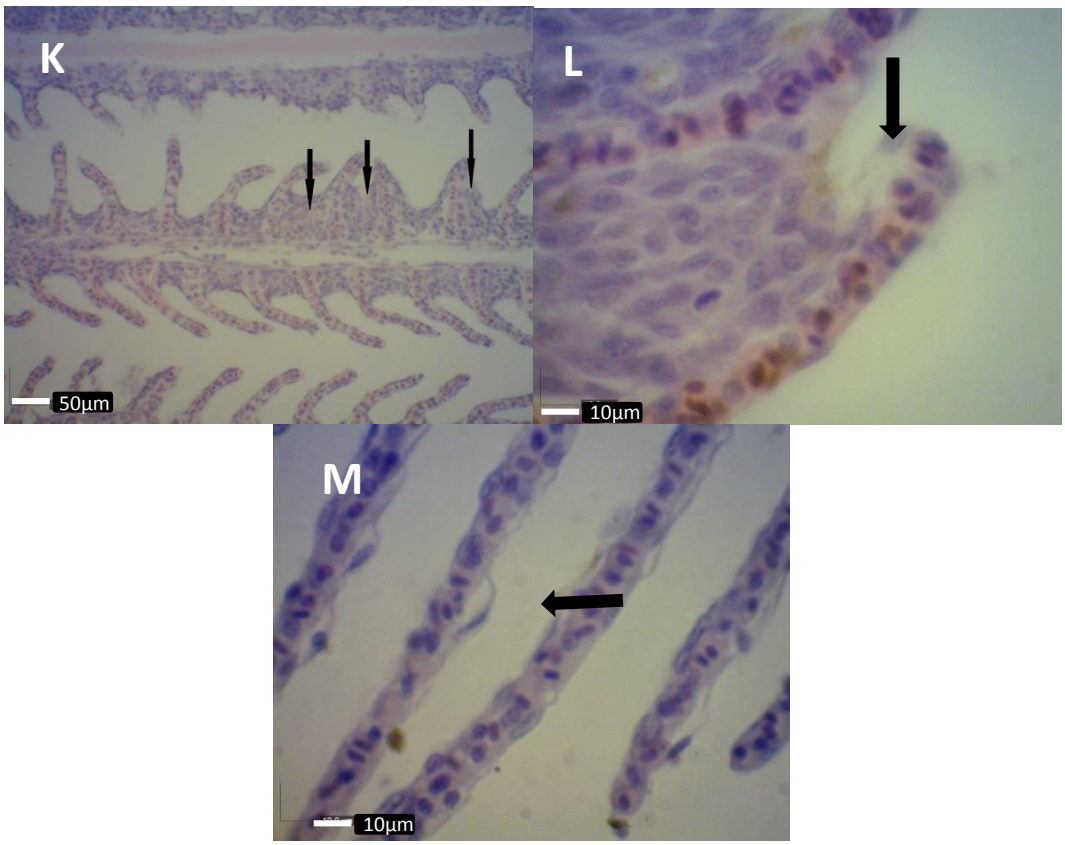


Figura 12. Fotomicrografia de brânquias de exemplars de *Metynnis maculatus* e *Rhamdia quelen* expostos à ammonia e coradas com HE (hematoxilina e eosina). A) acúmulo de pigmentos, B) aneurisma; C) bifurcação de lamela; D) congestão; E) descamação de epitélio; F) perda de adesão epithelial; G) edema; H) fibrose; I) fusão de lamelas; J) hemorragia; K) hiperplasia; l) hipertrofia e m) vacuolisação.

Em relação à maioria delas não houve diferença entre tratamentos de exposição (analisados de forma agrupada) e os resultado obtidos no controle. Além disso, nos casos em que houve diferença, nem sempre as alterações quantificadas nos tratamentos expostos a amônia foram maiores que as observadas no controle (Tabela 16), como seria esperado em uma relação dose/resposta.

A maior prevalência de alterações no controle aconteceu em relação à hiperplasia epitelial em *R. quelen* e edema em *M. maculatus.* Apenas congestão em *R. quelen* e hiperplasia em *M. maculatus* foram significativamente maiores nos tratamentos que no controle. Já uma

comparação direta entre as alterações teciduais apresentadas entre as espécies mostrou uma maior prevalência de congestão em *R. quelen* e de edema de epitélio em *M. maculatus.*

Tabela 16. Mediana dos Índices de Impactos Braquiais (IIBr) e (entre parênteses) o número total de alterações observadas em exemplares de *Rhamdia quelen* (1) e de *Metynnis maculatus* (2) nos controles e nos tratamentos expostos à amônia. As letras indicam resultados significativamente distintos (p<0,05) entre tratamentos de exposição e controle, de acordo com teste de Mann Whitney, bem como o resultado da comparação entre os índices agrupados (tratamento de exposição + controle) para as duas espécies (1x2).

Alterações	**IIBr**				
	Rhamdia quelen (1)		***Metynnis maculatus (2)***		***1 x 2***
	Exposição	**Controle**	**Exposição**	**Controle**	
Acúmulo de pigmentos	0,02 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1=2
Aneurisma	0 (0)	0 (0)	0,01 (1)	0 (0)	1=2
Bifurcação de lamela	0,01(2)	0,01(1)	0,01 (2)	0 (0)	1=2
Congestão	0,13[a] (38)	0,05[b] (11)	0,04 (15)	0,17 (2)	1>2
Descamação epitelial	0,05 (3)	0,01 (3)	0,01 (1)	0 (0)	1=2
Perda de adesão epitelial	0,11 (422)	0,10 (211)	0,11 (448)	0,13 (240)	1=2
Edema epitelial	0,10 (147)	0,09 (85)	0,21[b] (332)	0,29[a] (191)	2<1
Fibrose	0,08 (50)	0,10 (38)	0 (0)	0 (0)	1=2
Fusão de lamelas	0,04 (17)	0,04 (3)	0,07 (7)	0,05 (6)	1=2
Hemorragia	0,01 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1=2
Hiperplasia epitelial	0,04[b] (62)	0,07[a] (30)	0,06[a] (93)	0,03[b] (29)	1=2
Hipertrofia epitelial	0 (0)	0,01 (1)	0,03 (7)	0,07 (3)	1=2
Vacuolização	0,06 (1)	0 (0)	0,02 (4)	0 (0)	1=2

Os IIBr obtidos para cada alteração foram então comparados separadamente para cada uma das espécies estudadas ao longo do experimento, considerando individualmente cada tratamento. Para *M. maculatus* foi observado aumento do IIBr em função do aumento da concentração de amônia apenas em relação a hiperplasia epitelial. Para *R. quelen* tendência semelhante só foi observada para congestão (Figura 13).

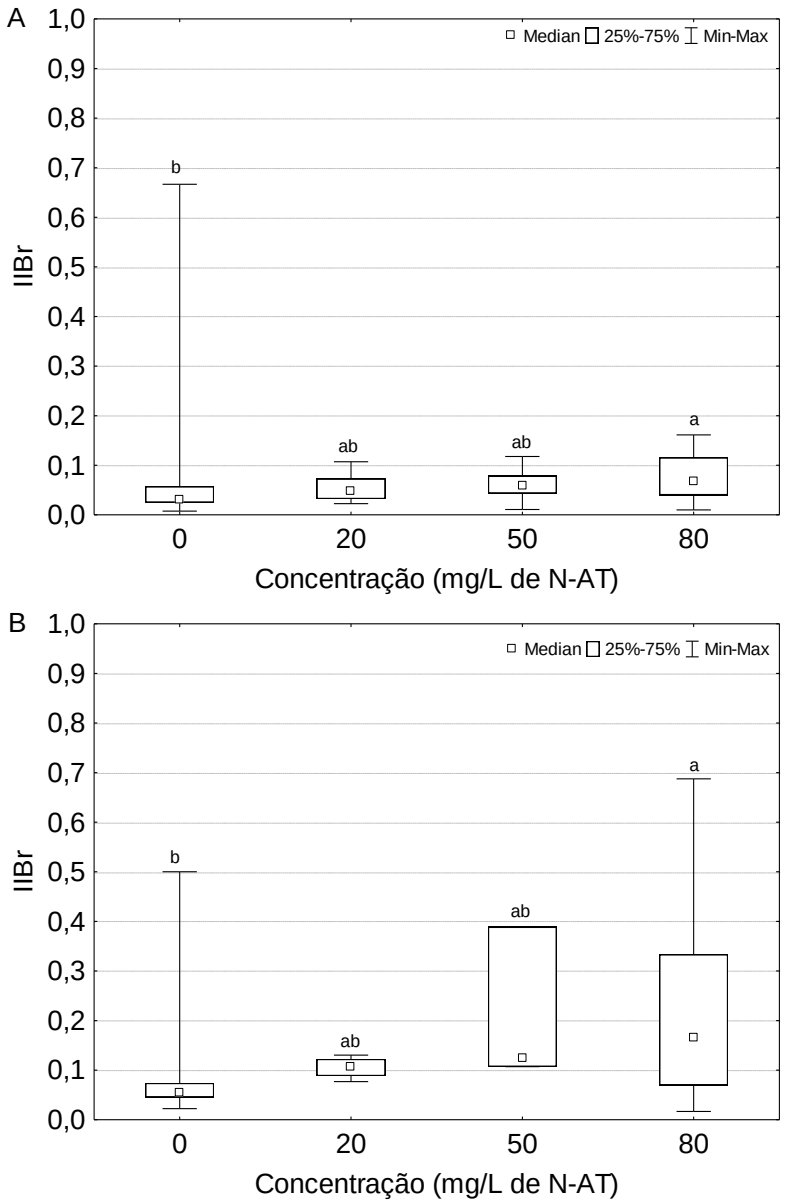


Figura 13. Índice de Impacto Branquial (IIBr) em A. *Metynnis maculatus* para a alteração hiperplasia de epitélio e B. *Rhamdia quelen* para a alteração congestão.

Quando os dois índices de impacto aqui empregados foram analisados em relação ao conjunto de alterações teciduais quantificadas para cada concentração e ao longo dos 40 dias de estudo, algumas diferenças significativas foram observadas.

Para exemplares de ambas as espécies houve aumento do I_{org}, após 40 dias de exposição, na concentração de 80 mg/L. Para *M. maculatus,* foram registradas diferenças nas três concentrações testadas para o IIBrT, sendo que os maiores índices foram observados no último dia de experimento em relação ao dia 20 (Tabela 17).

Quando usado o índice proposto por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) foi observado, para exemplares de *R. quelen,* diferenças estatísticas ao longo da exposição nas concentrações de 50 e 80 mg/L. Em ambas as concentrações foi observado aumento do índice no último dia de experimento (dia 40), quando os animais estavam em água sem a presença da amônia.

Comparando-se o conjunto de resultados obtidos para as duas espécies, observou-se que os índices de impacto para exemplares de *R. quelen* foram menores que os apresentados por *M. maculatus* para o IIBRT e para o I_{org}. Quando usado o IAH, entretanto, os valores de *R. quelen* foram superiores aos obtidos para *M. maculatus*.

Também foi observado que o período de exposição influenciou significativamente os três índices utilizados para *R. quelen*. Para *M. maculatus*, por sua vez, o feito significativo somente foi observado quando usados o I_{org} e IIBRT. Quando analisado o efeito das concentrações sobre os índices nenhum efeito significativo foi observado. A interação entre o período de exposição e as concentrações de amônia testadas apresentou efeito significativo somente para *M. maculatus* quando aplicado o IAH.

Tabela 17. Índices de Alterações Branquiais propostos por Cardoso (2006) (IIBrT), por Bernet, Schmidt et al. (1999) e por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994)(I_{org}) (p<0,05) aplicados ao longo do experimento de exposição à amônia (em forma de cloreto de amônio) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*.

Tratamento	Conc. (mg/L)	Período de exposição (dias)	Espécie					
			R. quelen	***M. maculatus***	***R. quelen***	***M. maculatus***	***R. quelen***	***M. maculatus***
			IIBrT		**I_{org}**		**IAH**	
Controle	0	4	0,53 (0,32 – 1,42)	1,49 (0,5 – 2,11)	1,99 (0,00 – 7,06)	6,82 (0,90 – 10,93)	20 (10,0 – 25,0)	8,00 (7,00 – 10,00)
	0	20	$0,37^{B}$ (0,15 0,80)	$1,65^{A}$ (0,83 – 2,11)	$0,03^{B}$ (0,00 – 2,89)	$6,87^{A}$ (0,85 – 11,05)	30 (10,0 – 30,0)	8,00 (7,00 – 17,00)
	0	30	$0,80^{B}$ (0,40 – 1,93)	$2,12^{A}$ (1,00 – 2,95)	$2,74^{B}$ (1,18 – 10,00)	$10,81^{A}$ (3,86 – 15,97)	20 (10,0 -90,0)	10,00 (8,00 – 17,00)
	0	40	$1,07^{B}$ (0,31 – 1,80)	$2,29^{A}$ (1,55 – 3,80)	$3,79^{B}$ (0,00 – 6,76)	$11,80^{A}$ (6,99 – 21,94)	45 (10,0 - 305,0)	17,5 (8,00 – 18,00)
Exposição	20	20	0,56 (0,23 – 1,39)	$0,88^{b}$ (0,41 – 1,77)	1,45 (0,00 – 6,00)	1,89 (0,08 – 9,96)	15 (5,0 – 35,0)	9,0 (8,0 – 17,0)
	20	30	$0,88^{B}$ (0,44 – 1,62)	$2,11^{aA}$ (1,28 – 2,80)	$3,32^{B}$ (1,09 – 6,90)	$8,98^{A}$ (4,00 – 15,01)	25 (15,0 – 205,0)	9,0 (8,0 – 10,0)
	20	40	0,57 (0,23 -1,19)	$1,56^{ab}$ (0,44 – 2,53)	0,97 (0,00 – 4,91)	6,94 (0,94 – 13,43)	35,0 (15,0 – 35,0)	13,0 (7,0 – 23,0)
	50	20	0,66 (0,42 – 1,03)	$0,70^{b}$ (0,21 – 1,53)	2,05 (0,90 – 5,00)	2,43 (0,05 – 6,47)	$20,0^{a}$ (10,0 - 45,0)	13,0 (8,0 – 22,0)
	50	30	0,68 (0,42 – 1,52)	$0,97^{ab}$ (0,32 – 2,73)	2,88 (0,90 – 8,05)	2,99 (0,00 – 14,00)	$20,0^{a}$ (10,0 - 30,0)	9,0 (8,0 – 25,0)
	50	40	$1,01^{B}$ (0,24 – 1,50)	$2,09^{aA}$ (1,15 – 2,77)	$3,00^{B}$ (0,00 – 6,90)	$9,44^{A}$ (4,00 – 14,48)	115^{b} (15,0 – 225)	8,0 (7,0 -13,0)
	80	20	$0,22^{B}$ (0,10 – 0,91)	$0,91^{bA}$ (0,43 – 1,14	$0,03^{b}$ (0,00 – 2,91)	$3,01^{b}$ (0,00 – 5,00)	$35,0^{b}$ (15,0 – 45,0)	9,0 (6,0 – 16,0)
	80	30	$0,48^{B}$ (0,40 – 0,62)	$1,14^{abA}$ (0,78 – 1,31)	$0,03^{bB}$ (0,00 – 0,95)	$2,87^{abA}$ (1,82 – 4,00)	$25,0^{b}$ (10,0 - 25,0)	16,0 (8,0 – 19,0)
	80	40	$1,23^{B}$ (0,40 – 2,37)	$2,59^{aA}$ (1,82 - 3,21)	$5,97^{aB}$ (2,00 – 12,45)	$13,93^{aA}$ (8,90 – 17,90)	$50,0^{a}$ (30,0 - 220,0)	9,0 (8,0 – 16,0)
Exposição		**Total**	$0,67^{B}$ (0,32 -1,36)	$1,50^{A}$ (0,71 – 1,53)	$1,72^{B}$ (0,00 – 5,00)	$6,90^{A}$ (10,2 – 13,70)	25,0 (14,0 – 50,0)^{A}	9,0 (8,0 - 17,0)^{B}
Concentração			0,89	0,08	0,88	0,07	0,51	0,34
Período de exposição			0,03	0,00	0,06	0,00	0,00	0,74
Conc. x Período de exposição			0,10	0,47	0,06	0,57	0,31	0,00

Letras maiúsculas, em linhas, significam diferenças entre as espécies pelo teste de Mann Whitney (p<0,05). Letras minúsculas, em colunas, significam diferenças entre os períodos de exposição, dentro de uma mesma concentração. A análise da influência dos períodos de concentração e de exposição sobre os índices foi realizada por meio de análise multivariada <0,05). Conc. – Concentração de amônia (mg/L) (na forma de cloreto de amônia) à qual os peixes foram expostos.

Histologia hepática

Em relação ao fígado, foram identificadas cinco alterações teciduais, sendo que hemorragia somente foi observada em um exemplar de *R. quelen* (Figura 14).

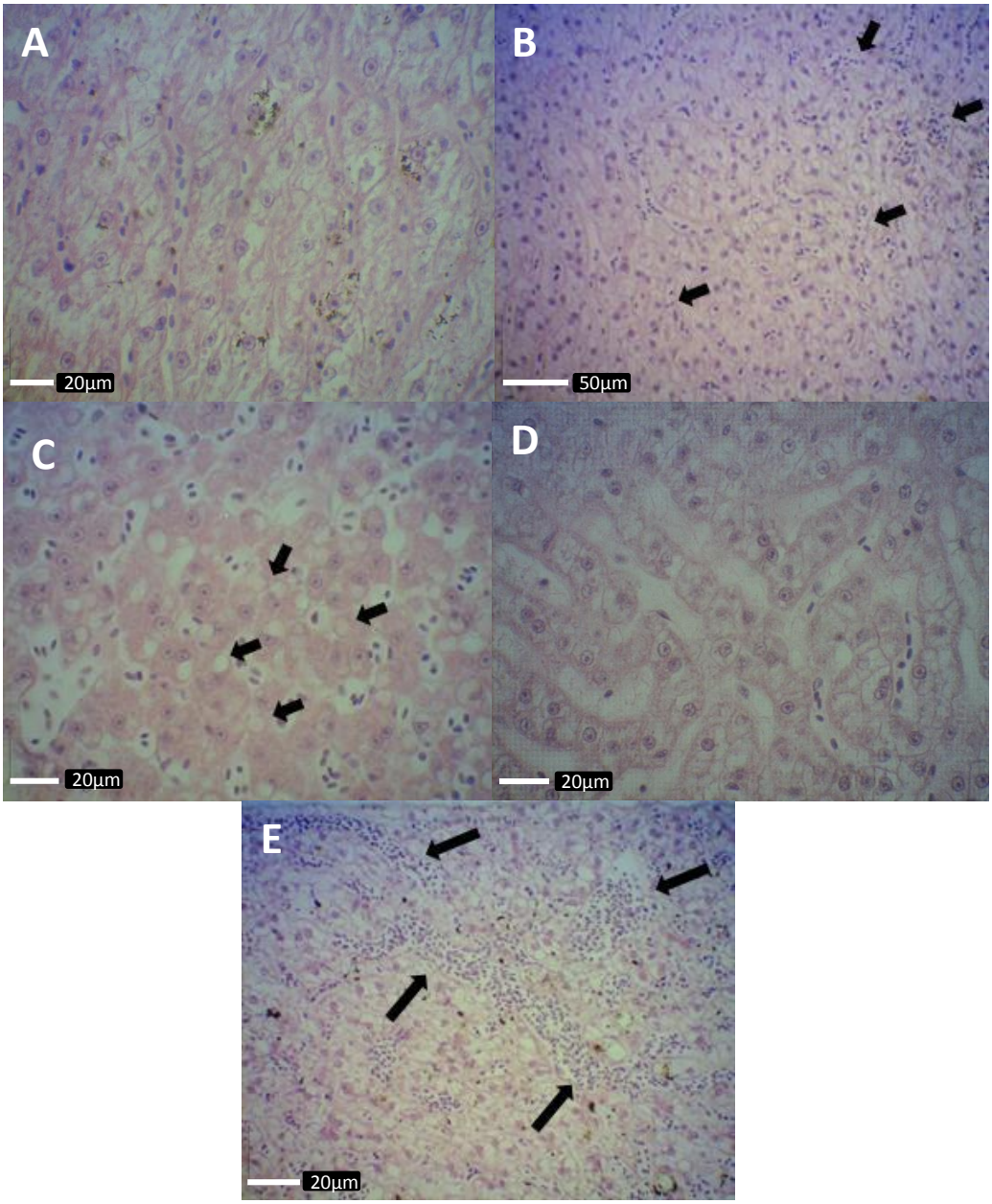


Figura 14. Fotomicrografia de fígado de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus* expostos à amônia e corado com HE (hematoxilina e eosina). A) Acúmulo de pigmento; B) Congestão vascular; C) Degeneração macroveseicular; D) Edema e E) Hemorragia.

Nenhuma das alterações hepáticas apresentadas por *R. quelen* foi maior nos tratamentos do que no controle, sendo que em relação a *M. maculatus* essa maior prevalência nos tratamentos expostos à amônia foi observada em relação ao acúmulo de pigmentos. Na comparação entre as espécies houve prevalência de degeneração gordurosa macrovesicular e edema em *R. quelen* e de acúmulo de pigmentos e congestão em *M. maculatus* (Tabela 18).

Tabela 18. Mediana dos Índices de Impactos Hepáticos (IIH) e (entre parênteses) o número total de alterações observadas em exemplares de *Rhamdia quelen* (1) e de *Metynnis maculatus* (2) nos controles e nos tratamentos expostos à amônia. As letras indicam resultados significativamente distintos (p<0,05) entre exposição e controle, de acordo com teste de Mann Whitney, bem como o resultado da comparação entre os índices agrupados (exposição + controle) para as duas espécies (1x2).

Alterações	**IIH**				
	***Rhamdia quelen* (1)**		***Metynnis maculatus* (2)**		***1 x 2***
	Exposição	**Controle**	**Exposição**	**Controle**	
Acúmulo de pigmentos	0,01[b] (84)	0,03[a] (49)	0,09[a] (11)	0,03[b] (43)	2>1
Congestão	0,05(110)	0,05 (81)	0,98 (178)	0,98 (73)	2>1
Degeneração gordurosa macrovesicular	0,98 (31)	0,01 (1)	0,50 (45)	0,98 (5)	1>2
Edema	0,99 (80)	0 (0)	0,50 (55)	0,50 (11)	1>2
Hemorragia	0,01 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1=2

Houve diferença para ambas as espécies, entre os índices de impactos hepáticos calculados para o conjunto de alterações teciduais em cada tratamento. No controle houve diferença ao longo do período de exposição, para ambos os índices utilizados. No tratamento de exposição a 80 mg/L foi observado aumento do I_{org} ao longo tempo somente para *R. quelen* (Tabela 19).

Para os dados agrupados, a concentração e a interação entre a concentração e os períodos de exposição apresentaram influência significativa sobre os índices histopatológicos obtidos para exemplares de *R. quelen*. O

período de exposição, por sua vez, não apresentou relação significativa sobre os índices obtidos.

Para *M. maculatus* o período de exposição apresentou influência significativa sobre os índices calculados, mas não as concentrações de amônia testadas e a influência da concentração sobre o período de exposição.

Os índices de impacto registrados de forma agrupada, para todas as concentrações ao longo de todo o período experimental, não diferiram estatisticamente entre as duas espécies analisadas.

Tabela 19. Índices de Alterações Hepáticas propostos por Cardoso (2006) (IIHT), e por Bernet, Schmidt et al. (1999) (I_{org}) ($p<0,05$) aplicados ao longo do experimento de exposição à amônia (mg/L de N- AT) para exemplares de *Rhamdia quelen* e *Metynnis maculatus*.

Tratamento	Conc. (mg/L)	Período de exposição (dias)	Espécie			
			R. quelen	***M. maculatus***	***R. quelen***	***M. maculatus***
			IIHT		**I_{org}**	
Controle	0	4	$0,18^{ab}$ (0,00 – 1,07)	$0,13^{b}$ (0,00 – 0,22)	$0,03^{b}$ (0,00 - 0,03)	$0,01^{b}$ (0,00 – 0,02)
	0	20	$2,45^{a}$ (1,75 – 5,00)	$2,22^{ab}$ (0,00 – 3,00)	$14,79^{a}$ (10,00 – 30,00)	$12,94^{ab}$ (0,00 – 17,90)
	0	30	$2,47^{ab}$ (0,00- 2,50)	$3,39^{a}$ 92,00 – 5,00)	$14,99^{ab}$ (15,00 – 30,00)	$16,05^{a}$ (11,08 – 30,00)
	0	40	$0,03^{b}$ (0,00 0,12)	$0,20^{ab}$ (0,00 – 1,00)	$0,03^{ab}$ (0,00 – 10,00)	$0,03^{ab}$ (0,00 – 6,00)
Exposição	20	20	0,46 (0,01 – 1,00)	1,46 (1,00 – 2,5)	2,96 (0,00 -6,00)	8,90 (5,86 – 15,00)
	20	30	1,21 (1,00 – 3,91)	1,02 (1,00 – 2,73)	6,89 (2,00 – 19,04)	6,19 (6,05 – 16,45)
	20	40	0,10 (0,00 – 2,39)	1,97 (6,68 – 3,00)	0,03 (0,00- 13,43)	12,21 (3,27 – 17,97)
	50	20	1,22 (0,06 – 3,00)	0,05 (0,00 – 3,67)	6,78 (0,00 – 17,84)	0,03 (0,00 – 21,95)
	50	30	0,95 (0,22 – 2,48)	1,98 (0,13 – 5,00)	3,80 (0,00 – 13,47)	11,95 (0,00 – 30,00)
	50	40	$0,03^{B}$ (0,00 – 2,31)	$3,98^{A}$ (2,15 – 5,00)	$0,03^{B}$ (0,00 – 13,93)	$24,06^{A}$ (11,95 – 30,00)
	80	20	2,23 (0,00 – 5,00)	2,55 (0,46 – 4,38)	$13,93^{b}$ (0,00 – 25,00)	15,92 (2,98 – 25,86)
	80	30	4,96 (3,04 – 5,00)	4,49 (1,76 – 5,00)	$29,99^{ab}$ (18,17 - 30,00)	26,71 (10,92 – 30,00)
	80	40	$4,95^{A}$ (4,94 – 4,96)	$2,21^{B}$ (1,38 – 3,33)	$29,99^{aA}$ (29,98 – 30,00)	$12,94^{B}$ (8,11 – 20,00)
Exposição		**Total**	1,45 (0,00 - 4,00)	1,99 (0,33-4,00)	7,15 (0,00 – 22,01)	11,68 (0,85 – 23,97)
Concentração			0,00	0,29	0,00	0,29
Período de exposição			0,10	0,00	0,11	0,00
Conc. x Período de exposição			0,00	0,10	0,00	0,13

Letras maiúsculas, em linhas, significam diferenças entre as espécies pelo teste de Mann Whitney ($p<0,05$). Letras minúsculas, em colunas, significam diferenças entre os períodos de exposição, dentro de uma mesma concentração. A análise da influência dos períodos de concentração e de exposição sobre os índices foi realizada por meio de análise multivariada ($p<0,05$). Conc. – Concentração de amônia (mg/L) (na forma de cloreto de amônia) à qual os peixes foram expostos.

Discussão

A análise dos valores de toxicidade da amônia, obtidos com base nas CL_{50} 96 h, calculadas para exemplares de *M. maculatus* (112,4 mg/L de N-AT) e de *R. quelen* (140,6 mg/L de N-AT) indicam que essas espécies apresentam tolerâncias compatíveis com as apresentadas por outras espécies já estudadas. Por exemplo, a Cl_{50} (96h) calculada para *Porichthys notatus* foi de 110 mg/L de N-AT (Wang and Walsh 2000) e de 187,34 mg/L de N-AT para exemplares *Hyphessobrycon callistus* (Damato and Barbieri 2011).

Já em relação à amônia não-ionizada os níveis de tolerância das diferentes espécies é mais variado. No presente estudo, CL_{50} 96 h para *R. quelen* foi calculada em 0,94 mg/L de $N\text{-}NH_3$, enquanto para *M. maculatus* foi de 0,71 mg/L de N-NH. Estudo realizado com exemplares de *Hyphessobrycon callistus* por Damato and Barbieri (2011) calcularam Cl_{50} (96h) que variou de 0,068 a 0,090 mg/L de $N\text{-}NH_3$. Randall and Tsui (2002) analisando os resultados obtidos para 32 espécies de peixes de água doce chegou a uma CL_{50} média de 2,79 mg/L de $N\text{-}NH_3$.

A discrepância entre os níveis de tolerância à amônia apresentados por diferentes espécies indicam a possibilidade de existência de mecanismos adaptativos à este composto. Wang and Walsh (2000) sugerem que esses mecanismos podem estar relacionados à redução da permeabilidade da membrana branquial, o que conferiria a algumas espécies a capacidade de evitar a entrada da amônia no organismo. Outro mecanismo estaria relacionado à capacidade do organismo em reduzir a toxicidade dos compostos nitrogenados por meio de processos de transformação química ou até mesmo aumentando as taxas de excreção de amônia através da urina (Heath 1995).

Segundo Barcellos, Woehl et al. (2001) e Souza-Bastos and Freire (2009) outros fatores que poderiam refletir na tolerância dos peixes são o estresse causado pela manipulação dos animais e pela manutenção dos mesmos em cativeiro.

No presente estudo, as análises realizadas nas brânquias evidenciaram uma possível existência de diferenças espécie-específicas em relação à tolerância de *R. quelen* e de *M. maculatus* à amônia. Neste caso, *R. quelen* apresentou menores índices de impactos teciduais (IIBRT e I_{org}) que *M. maculatus.* A existência de diferenças entre as espécies poderiam estar relacionadas às diferenças anatômicas branquiais existentes entre elas. Segundo Baldisserotto (2013) as espécies mais ativas apresentam uma maior área branquial que espécies que apresentam menor atividade. Segundo o mesmo autor, os peixes são capazes de regular a área da superfície respiratória funcional modificando a área lamelar, que é perfundida por sangue, característica importante para ajustar rapidamente a captação de oxigênio de acordo com as necessidades do momento. Como a presença de amônia pode afetar o transporte de oxigênio nos tecidos (Damato and Barbieri 2011) esta adaptação é importante para a sobrevivência dos indivíduos quando em ambiente com alta concentração de amônia. Estudo realizado por Frances, Nowak et al. (2000) utilizando exemplares de perca prata (*Bidyanus bidyanus*) expostos a amônia indicam que houve redução da capacidade de difusão da brânquia por meio da diminuição da sua superfície e na capacidade de trocas gasosas.

Quando aplicado o IAH, *R. quelen* apresentou maior índice de alterações teciduais quando comparado a *M. maculatus*. Pode-se considerar que a aplicação de diferentes índices, os quais possuem abordagens distintas, possa estar causando as diferenças entre os resultados.

O fato de os índices propostos por Bernet, Schmidt et al. (1999) e Cardoso (2006) considerarem o tamanho da alteração ou o número de lamelas alteradas e o índice proposto por Poleksic and Mitrovic-Tutundzic (1994) não utilizar estes parâmetros pode estar causando as diferenças nos resultados. Uma mesma alteração, como por exemplo, fusão de lamelas, quando analisada pelos índices I_{org} ou IIBrT, apresenta valores distintos devido ao tamanho da alteração ou ao número de lamelas que apresentam a alteração. Quando usado o IAH, entretanto, as alterações recebem o mesmo valor, não importando o tamanho da alteração. O fato das alterações serem multiplicadas por 10^0, 10^1 ou 10^2, de acordo com o estágio de comprometimento das funções das brânquias também pode ter influenciado os resultados obtidos. Por exemplo, exemplares de *R. quelen* apresentaram fibrose, alteração considerada de estágio 3, enquanto que *M. maculatus* não presentou nenhuma alteração classificada neste estágio.

A hiperplasia de epitélio branquial variou de acordo com o aumento da concentração de amônia para *M. maculatus*. Tal alteração tem sido relacionada com a exposição à amônia em várias espécies de peixes, como tilápias, *Oreochromis niloticus* (Benli and Koksal 2005, El-Sherif, El-Feky et al. 2008, El-Shebly and Gad 2011), carpas, *Cyprinus carpio* (Chezhian, Senthamilselvan et al. 2012, Devaraj, Arulprakasam et al. 2014), e jundiás, *Rhamdia quelen* (Miron,

Moraes et al. 2008). A hiperplasia epitelial, entretanto, também foi observada em peixes coletados em canais de irrigação (Abdel-Moneim, Al-Kahtani et al. 2012), em peixes expostos à vários produtos químicos (Agamy 2013, Barja-Fernández, Míguez et al. 2013) e também a metais pesados (Oliva, Garrido et al. 2009). Esta alteração é causada pelo aumento da quantidade de células, decorrente do aumento da atividade mitótica das células epiteliais, localizadas na base das lamelas e/ou do epitélio respiratório que as revestem (Thomson 1978). Esse aumento na quantidade de células pode causar um espessamento das lamelas, podendo prejudicar as trocas gasosas (Hinton, Baumann et al. 1992). No presente estudo, entretanto, as trocas possivelmente não foram significativamente afetadas, uma vez que os casos de hiperplasia epitelial eram pontuais.

A congestão, por sua vez, pode ser definida como o acúmulo de sangue em uma determinada região e, de acordo com Thomson (1978), pode ser causada pela existência de um obstáculo físico que impeça o fluxo sanguíneo.

Em exemplares de *R. quelen,* o índice de impacto relacionado a congestão aumentou significativamente quando os animais foram expostos a 80 mg/L de N-AT. Este padrão, entretanto, não se repetiu para *M. maculatus*. Esta alteração, por sua vez, é frequentemente citada como resultado da exposição de peixes à pesticidas (Mataqueiro, Nakaghi et al. 2009, Rudnicki, Melo et al. 2009), a produtos químicos diversos (Fanta, Rios et al. 2003, Barja-Fernández, Míguez et al. 2013) e também registrada em peixes coletados diretamente de ambientes alterados (Camargo and Martinez 2007). Assim

sendo, a congestão não é uma alteração específica para um determinado tipo de contaminante.

Os índices de Impacto Hepáticos registrados em *R. quelen* e analisados de forma agrupada foram significativamente influenciados pela concentração de amônia a que os animas estavam expostos. Também a interação entre a concentração e o período de exposição apresentaram relação significativa. Por outro lado, nenhuma das alterações individuais observadas no fígado das espécies analisadas apresentou relação significativa com as concentrações de amônia testadas. Desta forma, pode-se postular que a exposição dos peixes a concentrações subletais de amônia, embora não leve necessariamente ao surgimento de doenças hepáticas específicas, pode levar a uma piora geral nas funções hepáticas dos animais a ela expostos.

Tais resultados evidenciam a necessidade do uso, ainda relativamente raro na literatura científica, de indicadores quantitativos em estudos histopatológicos de impactos teciduais decorrentes da exposição de peixes a compostos químicos, como é o caso da amônia. A simples descrição de lesões celulares, sem o concomitante uso de indicadores quantitativos, pode levar a interpretações errôneas ou incompletas dos resultados.

No presente caso, as análises indicaram que nenhuma das lesões celulares observadas no fígado dos peixes expostos à amônia pode ser inequivocamente relacionada a essa exposição. Já no caso das brânquias, há evidências de que a exposição à amônia pode induzir a ocorrência de hiperplasia epitelial e de congestão. Ao mesmo tempo, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que diferentes espécies podem responder de forma

distinta à exposição à amônia e que os diferentes índices quantitativos aqui estudados podem proporcionar resultados contrastantes e não comparáveis diretamente entre si.

Referências

Abalaka , S. E., M. Y. Fatihu, N. D. G. Ibrahim and S. F. Ambali (2015). "Gills and skin histopathological evaluation in African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* exposed to ethanol extract of *Adenium obesum* stem bark." Egyptian Journal of Aquatic Research: 1-9.

Abdel-Moneim, A. M., M. A. Al-Kahtani and O. M. Elmenshawy (2012). "Histopathological biomarkers in gills and liver of *Oreochromis niloticus* from polluted wetland environments, Saudi Arabia." Chemosphere **88**: 1028–1035.

Abdel-Warith, A. A., E. M. Younis, N. A. Al-Asgah and O. M. Wahbi (2011). "Effect of zinc toxicity on liver histology of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*." Scientific Research and Essays **6**(17): 3760-3769.

ABNT (2004). "ABNT NBR 15088:04 (Brazilian Association of Technical Standards), Aquatic Ecotoxicology) - Acute toxicity - Test method with fish." 19.

Agamy, E. (2013). "Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study." Marine Environmental Research **86**: 46-55.

Agius, C. and R. J. Roberts (2003). "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." Journal of Fish Diseases **26**: 499-509.

Agus, H. H., B. Erkmen, S. Sumer, A. S. Dinc¸el and F. Erkoc (2015). "Impact of DBP on histology and expression of HSP 70 in gill and liver tissue of *Cyprinus carpio*." Molecular biology reports **42**: 1409-1417.

Akaishi, F. M., H. C. Silva De Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eirasstofella, S. D. ST-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira-Ribeiro (2004). "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. ." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**: 244-253.

Akaishi, F. M., H. C. Silva de Assis, S. C. G. Jakobi, D. R. Eirasstofella, S. D. St-Jean, S. C. Courtenay, E. F. Lima, A. L. R. Wagener, A. L. Scofield and C. A. Oliveira Ribeiro (2004). "Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **46**(2): 244-253.

Akhavana, S. R., B. Falahatkara, M. H. T. Gilanib and P. M. Lokman (2015). "Effects of estradiol-17β implantation on ovarian growth, sex steroid levels and vitellogenin proxies in previtellogenic sturgeon *Huso huso*." Animal Reproduction Science **157**: 1-10.

Al-Bairuty, G. A., B. J. Shawa, R. D. Handya and T. B. Henrya (2013). "Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquatic Toxicology **126**: 104- 115.

Al-Ghanbousi, R., T. Ba-Omar and R. Victor (2012). "Effect of deltamethrin on the gills of Aphanius dispar : a microscopic study." Tissue cell **44**: 7-14.

Albinati, A. C. L. (2009). "Histological biomarkers - chronic toxicity for roundup in piauçu (*Leporinus macrocephalus*)." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. **61**(3): 621-627.

Albinati, A. C. L., E. L. T. Moreira, R. C. B. Albinati, J. V. Carvalho and L. A. D. (2009). "Biomarcadores histológicos - toxicidade crônica pelo Roundup em piauçu (*Leporinus macrocephalus*)." Arq. Bras. Med. Vet. Zootec **61**(3): 621-627.

Altinok, I. and E. Capkin (2007). "Histopathology of Rainbow Trout Exposed to Sublethal Concentrations of Methiocarb or Endosulfan." Toxicology pathology **35**: 405-410.

Altinok, I. and J. M. Grizzle (2003). "Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish." World Aquac. Soc **34**(1): 113-117.

Ameur, W. B., Y. El Megdiche, J. Lapuente, B. Barhoumi, S. Trabelsi, S. Ennaceur, L. Camps, J. Serret, D. Ramos-López, J. Gonzalez-Linare, M. H. Driss and M. Borràs (2015). "Oxidative stress, genotoxicity and histopathology biomarker responses in *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* gill exposed to persistent pollutants. A field study in the Bizerte Lagoon: Tunisia " Chemosphere **135**: 67-74.

Amiri, S., H. V. Roudsari and R. Kazemi (2011). "Histopathological studies on gill tissue of caspian Vimba (*Vimba vimba persa*) from Caspian Sea And Sefidrud River, Iran." International Conference on Chemical, Ecology and Environmental Sciences.

Anderson, D. P. (1992). "Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: Applications to aquaculture." Annual Review of Fish Diseases **2**(0): 281-307.

Andrade, L. S., R. L. B. Andrade, A. G. Becker and B. Baldisserotto (2006). "Survival and behavior of silver catfish, *Rhamdia quelen*, submitted to antibiotics and sodium chloride treatments." Ciência Rural **36**(3): 1004-1007.

Arellano, J. M., V. Storch and C. Sarasquete (1999). "Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the senegales sole *Solea senegalensis*." Ecotoxicology and Environmental Safety **44**(1): 62-72.

Arenzon, A., R. F. Pinto, P. Colombo and M. T. Raya-Rodriguez (2003). "Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(9): 2188–2190.

Arillo, A., C. Margiocco, F. Melodia, P. Mensi and G. Schenone (1981). "Ammonia toxicity mechanism in fish: Studies on rainbow trout (Salmo gairdneri Rich.)." Ecotoxicology and Environmental Safety **5**(3): 316-328.

Arya, A. and G. T. Sharma (2015). "Combined effects of cadmium and mecury on some biochemical and histochemical changes in liver, kidney and gills of

*Channa punctatus (*bloch)." International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences **7**(8): 117-120.
Athikesavan, S., S. Vincent, T. Ambrose and B. Velmurugan (2006). "Nickel induced histopathological changes in the different tissues of freshwater fish, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes)." Journal of Environmental Biology **27**(2): 391-395.
Ayoola, S. O. (2008). "Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile." African Journal of Agricultural Research **3**(12): 825-834.
Baldisserotto, B. (2013). Fisiologia de peixes aplicada a piscicultura. Santa Maria.
Baldisserotto, B. and L. V. F. Silva (2004). The quality of the water. In: Bernardo Baldisserotto; João Radünz Neto. (Org.). Criation of "jundiá".
Banerjee, S. and S. Bhattacharya (1994). "Histopathology of kidney of *Channa punctatus e*xposed to chronic nonlethal level of elsan, mercury, and ammonia." Ecotoxicoligal and environmental safety **29**: 265-275.
Barcellos, L. J. G., V. W. Woehl, G. F. Wassermann, R. M. Quevedo, I. Ittzés and M. H. Krieger (2001). "Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. ." Aquaculture research **32**: 121-123.
Barišić, J., Z. Dragun, S. Ramani, V. F. Marijić, N. Krasnići, R. Čož-Rakovac, V. Kostov, K. Rebok and M. Jordanova (2015). "Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (Squalius vardarensis Karaman)as an indicator of river pollution." Ecotoxicology and Environmental Safety **118**: 158-166.
Barja-Fernández, S., J. M. Míguez and R. Álvarez-Otero (2013). "Histopathological effects of 2,2′,4,4′-tetrabromodiphenylether (BDE-47)in the gills,intestine and liver of turbot (*Psetta maxima*)." Ecotoxicology and evironmental safety **95**: 60-68.
Barreto, T. R. (2006). Alterações morfofuncionais e metabólicas no teleósteo de água doce matrinxã, *Brycon cephalus* (GÜNTHER, 1869) exposto ao organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®). mestre, Universidade Federal de São Carlos.
Barton, A. B. (2002). "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids." Integrative and Comparative Biology(42): 513-525.
Barton, B. A. and R. E. Zitzow. (1995). "hysiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water." Progressive Fish-Culturist **57**: 267–276.
Bastos, L. R. S. (2011). Fisiologia de teleósteos expostos a contaminação e alterações nas concentrações de amônia, sal e oxigênio. Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
Beçak, W. and J. Paulete (1976). Cytology and histology techniques.
Beçak, W. and J. Paulete (1976). Técnicas de citologia e histologia.
Behmer, O. A., E. M. C. Tolosa and A. G. Freitas-Neto (1976). Manual de técnicas histológicas para histologia normal e patológica.

Behr, E. R., J. R. Neto, A. P. Tronco and A. P. Fontana (1999). "Influência de diferentes níveis de luminosidade sobre o desempenho de larvas de Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: pimelodidae)." Acta Scientiarum **21**(2): 325-330.

Benli, A. A. K. and G. Koksal (2005). "The Acute Toxicity of Ammonia on Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Larvae and Fingerlings." Turk J Vet Anim Sci **29**: 339-344.

Benli, A. A. K. and G. Koksal (2005). "The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Larvae and Fingerlings." Turkish Journal of Veterinary and Animal Science **29**: 339-344.

Benli, A. C. K., G. Köksal and A. Özkul (2008). "Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (Oreochromis niloticus L.): Effects on gill, liver and kidney histology." Chemosphere **72**(9): 1355-1358.

Benli, A. C. K., G. Köksal and A. Özkul (2008). "Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticu*s L.): Effects on gill, liver and kidney histology." Chemosphere **72**: 1355-1358.

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic poluttion." Journal of fish disease **22**: 25-34.

Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish proposal for a protocol to assess aquatic poluttion." Journal of fish disease **22**(25-34).

Bervoets, L., D. Knapen, M. Jonge, K. V. Campenhout and R. Blus (2013). "Differential Hepatic Metal and Metallothionein Levels in Three Feral Fish Species along a Metal Pollution Gradient " Plos one **8**(3).

Boran, H., E. Capkin, I. Altinok and E. Terzi (2012). "Assessment of acute toxicity and histopathology of the fungicide captan in rainbow trout." Experimental and Toxicologic Pathology **64**(3): 175-179.

Borba, M. R. (2005). Efeito de níveis de suplementação de vitamina C na dieta sobre a susceptibilidade de alevinos de jundiá, Rhamdia quelen, ao ectoparasito Ichthyophthirius multifiliis. Pós - doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina.

Boyd, C. E. and C. S. Tucker (1998). Pond aquaculture water quality management.

Brandão, D. A. (2004). Profilaxia e Doenças. In: Baldisserotto & Radünz Neto. Criação de jundiá.

Bringolf, R. B., T. J. Kwak, W. G. Cope and M. S. Larimore (2005). "Salinity tolerance of flathead catfish: implications for dispersal of introduced population." Transactions of the American Fisheries Society **134**: 927-936.

Camargo, M. M. P. and C. B. R. Martinez (2007). "Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream." Neotropical Ichthyology, **5**(3): 327-336.

Campos, C. M., J. R. E. Moraes and F. R. Moraes (2011). "Histopathology of gills of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) and *Prochilodus lineatus* (Valenciennes,1836) infested by monogenean and myxosporea, caugth in Aquidauana River, State of Mato Grosso do Sul, Brazil." Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária **20**(1): 67-70.

CANADA, E. (1990). Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. E.P.S. 1/RM/12.
Cantanhêde, S. M., A. M. Medeiros, F. S. Ferreira, J. R. C. Ferreira, L. M. C. Alves, M. V. J. Cutrim and D. M. S. Santos (2014). "Uso de biomarcador histopatológico em brânquias de *Centropomus undecimalis* (Bloch, 1972) na avaliação da qualidade da água do Parque Ecológico Laguna da Jansen, São Luís - MA." Arq. Bras. Med. Vet. Zootec **66**(2): 593-601,.
Cardoso, M. F. (2006). Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais. Mestrado, Universidade Federal do Paraná.
Cardoso, M. F. (2006). "Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais."
Cardoso, M. F. (2006). Efeitos da sísmica com cabo de fundo sobre peixes recifais. i. d. P.-G. e. C. V.-U. F. d. Paraná.
Cardoso, M. F. (2006). Effects of seismic with bottom cable on reef fish master's degree - http://livros01.livrosgratis.com.br/cp011737.pdf, Federan University of Paraná.
Carneiro, P. C. F., S. M. Cirio and M. Schorer (2006). "Estudo anatomopatológico de alevinos de jundiá infectados experimentalmente por Ichthyophtirius multifiliis e submetidos a tratamentos convencionais. ." Archives of Veterinary Science **11**(1): 33-38.
Carneiro, P. C. F., S. M. Cirio and M. Schorer (2006). "Pathological study of silver catfish fingerlings experimentally infected *Ichthyophtirius multifiliis* and subjected to conventional treatments." Archives of Veterinary Sciences **11**: 33-38.
Carneiro, P. C. F., M. Schorer and J. D. Mikos (2005). "Conventional therapeutic treatments in controlling ectoparasites *Ichthyophtirius multifiliis* in jundiá (*Rhamdia quelen*)." Pesquisa Agropecuária Brasileira **40**: 99-102.
Carneiro, P. C. F., M. Schorer and J. D. Mikos (2005). "Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophtirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*)." Pesq. agropec. bras. **40**(1): 99-102.
Cengiz, E. I. and E. Unlu (2006). "Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin." Environmental Toxicology and Pharmacology **22**: 200–204.
CETESB (1990). "Companhia de Tecnologia e Saniamento Ambiental - Implementação de testes de toxicidade no controle de efluentes liquídos.".
Ceyhun, S. B., S. M., D. Ekinci, O. ERDOĞAN, A. ÇiltasŞ and E. M. Kocaman (2010). "Deltamethrin attenuates antioxidant defense system and induces the expression of heat shock protein 70 in rainbow trout." Comparative Biochemistry and Physiology, Part C. **152**: 215-223.
Cheng, C.-H., F.-F. Yang, R.-Z. Ling, S.-A. Liao, Y.-T. Miao, C.-X. Ye and A.-L. Wang (2015). "Effects of ammonia exposure on apoptosis, oxidative stress and immune response in pufferfish (Takifugu obscurus)." Aquatic Toxicology **164**(0): 61-71.
Chezhian, A., D. Senthamilselvan and N. Kabilan (2012). "Histological changes induced by ammonia and pH on the gills of fresh water fish *Cyprinus carpio* var. communis (Linnaeus). ." Asian J Anim Vet Adv **7**(588-596).

Costa, P. M., M. S. Diniz, S. Caeiro, J. Lobo, M. Martins, A. M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T. A. Delvassa and E. Costa (2009). "Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach." Aquatic Toxicology **92**: 202–212.

Crestani, M., C. Menezes, G. Glusczak, D. S. Miron, R. Spanevello, A. Silveira, F. F. Gonc¸alves, R. Zanella and V. L. Loro (2007). "Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern." Chemosphere **67**: 2305-2311.

Cruz, C., P. Cubo, G. R. Gomes, F. P. Venturini, P. E. Guilherme and R. A. Pitelli (2008). "Sensibilidade de Peixes Neotropicais ao Dicromato de Potássio." J. Braz. Soc. Ecotoxicol **13**(1): 53-55.

Cunico, A. M., W. J. Graça, S. Veríssimo and L. M. Bini (2002). "Influência do nível hidrológico sobre a assembléia de peixes em lagoa sazonalmente isolada da planície de inundação do alto rio Paraná " Acta Scientiarum **24**(2): 383-389.

Dalfovo, M. S., R. A. Lana and A. Silveira (2008). "Métodos quantitativos e qualitativos: um resgate teórico. ." Revista Interdisciplinar Científica Aplicada **2**(4): 01-13.

Dallinger, R. and P. S. Raimbow (2003). Ecotoxicology of metals in invertebrates. Society of Environmental Toxicology and Chemistry Special Publication Series.

Dalvi, R. S., A. K. Pal, L. R. Tiwari and K. Barua (2012). "Influence of acclimation temperature on the induction of heat-shock protein 70 in the catfish *Horabagrus brachysoma* (Gunther)." Fish Physiology and Biochemistry **38**: 919–927.

Damato, M. and E. Barbieri (2011). "Determination of ammonia chloride acute toxicity for a region specific fish species (*Hyphessobrycon callistus*)." O mundo da saúde **35**(4): 401-407.

Devaraj, S., c. Arulprakasam, A. P. Kandhan, K. Neelamegam and R. Kalaiselvan (2014). "Toxicological effects of ammonia on gills of *Cyprinus carpio* var. communis (Linn.)." Journal of Coastal Life Medicine **2**(2): 94-98.

Dias, D. C., F. C. Maiorino, M. J. T. Ranzani-Paiva, N. M. Ishikawa, j. V. Lombardi, j. R. Ferreira, F. M. França and C. M. Ferreira (2007). "Avaliação histopatológica do baço, coração e encéfalo de tilápia *Oreochromis niloticus* (LINNAEUS, 1758) exposta ao cloreto de mercúrio. ." Boletim do Instituto de Pesca **33**(2): 213-220.

Dickerson, H. W. and D. L. Dawe (1995). "Ichthyophthirius multifiliis and Cryptocaryon irritans (Phylum Ciliophora). In: Woo P (ed) Fish diseases and disorders. CAB International, Wallingford." **181-227**.

Diricx, M., A. K. Sinha, H. J. Liew, N. Mauro, R. Blust and G. De Boeck (2013). "Compensatory responses in common carp (Cyprinus carpio) under ammonia exposure: Additional effects of feeding and exercise." Aquatic Toxicology **142–143**(0): 123-137.

Domingos, F. X. D., H. C. S. Assis, M. D. Silva, R. C. Damian, A. I. M. Almeida, M. M. Cestari, M. A. F. Randi and C. A. O. Ribeiro (2009). "Anthropic impact evaluation of two Brazilian estuaries through biomarkers in fish." Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology **4**(1-3): 21-30.

Domingos, F. X. V., H. C. S. Assis, M. D. Silva, R. C. Damian, A. I. M. Almeida, C. M. M., M. A. F. Randi and C. A. O. Ribeiro (2009). "Anthropic impact evaluation of two brazilian estuaries trough biomarkers in fish." journal of brazilian society of ecotoxicology **4**(1-3): 21-30.
Duce, R. A. and P. S. Liss (1991). "The atmospheric input of trace species to the world ocean." Global Biogeochemical Cycles **5**: 193-259.
Durborow, R. M., C. D.M. and M. W. Brunson (1997). "Ammonia in fish ponds." Stoneville: Southern Regional Aquaculture Center.
Eiras, J. C. (1994). Elementos de ictioparasitologia. Porto, Portugal, Fundação Eng. Antônio de Almeida.
Eiras, J. C. (1994). Elements of ictioparasitology. Porto, Portugal.
Eiras, R. C., G. C. Pavanelli, M. J. T. Paiva and R. M. Taketmoto (1999). "Gill histopathology of *Piaractus mesopotamicus* (osteichthyes: serrasalmidae) infected by *Henneguya piaractus* martins et souza, 1997 (myxozoa: myxobolidae). ." Research and Reviews in Parasitology **59**(3-4): 117-120.
El-Shebly, A. A. and H. A. M. Gad (2011). "Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Journal of Microbiology and Biotechnology Research **1**(4): 183-197.
El-Shebly, A. A. and H. A. M. Heba Allah M. Gad (2011). "Effect of chronic ammonia exposure on growth performance, serum growth hormone (GH) levels and gill histology of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Journal of Microbiology and Biotechnology Research **1**(4): 183-197.
El-Sherif, M. S., El-Feky and M. Amal (2008). "Effect of ammonia on nile tilapia (*O. niloticus*) performance and some hematological and histological measures." 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture.
EPA (2002). United States of Environmental Protection Agency. Methods of measuring the acute toxicity of effluents and receiving eaters to freshwater and marine organisms. Washington, EUA.
Evans, D. H. (1993). The Physiology of Fish.
Evans, D. H., P. M. Piermarini and K. P. Choe (2005). "The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste." Physiological Reviews **85**(0): 97-177.
Evans, J. J., D. J. Pasnik, M. Yildimirim-Aksoy, C. Lim and P. H. Klesius (2010). "Histologic changes in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, fed diets containing graded levels of gossypol–acetic acid." Aquaculture nutrition **16**(4): 385-391.
Fanta, E., F. S. Rios, S. Romão, A. C. C. Vianna and S. Freiberger (2003). "Histopathology of fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food." Ecotoxicology and Environmental Safety **54**(2): 119-130.
Ferguson, H. W. (1989). Systemic pathology of fish: a text and atlas of comparative tissue responses in deseases of teleosts.
Fernandes, A. F., J. V. F. Cardoso, S. G. Santos, S. M. Monteiro, J. Carrola, P. Matos and A. F. Fernandes (2007). "Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus,* exposed to waterborne copper." Pesquisa veterinária brasileira **27**(3): 103-109.

Fernandes, M. N. and A. F. Mazon (2003). "Environmental pollution and gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. (Eds.). ." Fish adaptations. USA: Science Publishers.: 203 - 231.
Fernandes Neto, M. L. and P. N. Sarcinelli (2009). "Pesticides in drinking water: a risk assessment approach and contribution to the Brazilian legislation updating process." Revista engenharia sanitária **14**(1): 69-78.
Ferraz de Lima, C. L. B., N. S. Reis and P. S. Ceccarelli (1991). "Caracterização histológica da ictiofitiriase em pacu, *Piractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae)." Boletim Técnico CEPTA **4**(2): 8.
Ferraz de lima, C. L. B., N. S. Reis and P. S. Ceccarelli (1991). "Histological characterization of ichthyophthiriasis in pacu, Piractus mesopotamicus Holmberg, 1887 (Teleostei, Serrasalminae)." Boletim Técnico CEPTA **4**(8).
Figueiredo-Fernandes, A., A. Fontaıhas-Fernandes, E. Rocha and M. A. Reis-Henriques (2006). "Effects of gender and temperature on hepatic EROD activity, liver and gonadal histology in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. ." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **51**: 626-632.
Flores-Lopes, F. and A. T. Thomaz (2011). "Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring." brazilian journal of biology **71**(1): 179-188.
Frances, J., B. F. Nowak and G. L. Allan (2000). "Effects of ammonia on juvenile silver perch *Bidyanus bidyanus*." Aquaculture **183**: 95-103.
Fujimoto, R. Y., C. Cruz and F. R. Moraes (2008). "Analysis of effluent and histology of the skin, liver and kidney pacu (*Piaractus mesopotamicus*) supplemented with trivalent chromium." Boletim do Instituto da Pesca **34**(1): 117-124.
Gagnon, M. M. and P. V. Hodson (2012). "Field studies using fish biomarkers – How many fish are enough?" Marine Pollution Bulletin **64**(12): 2871-2876.
Galvan, G. L. (2015). Efeitos ecotoxicológicos da fração solúvel do petróleo e gasolina: integrando relevantes organismos e biomarcadores. Doutorado, Universidade Federal do Paraná.
Ganeko, L. N. (2003). Análise dos ovos de piracanjuba, Brycon orbignyanus (Valenciennes, 1849) durante a fertilziação e o desenvolvimento embrionário, sob condições de reprodução induzida. mestrado, Centro de Aquicultura da UNESP.
Garcia-Santos, S., S. M. Monteiro, J. Carrola and A. Fontainhas-Fernandes (2007). "Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilotica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio." Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. **59**(2): 376-381.
Garcia, L. O., A. G. Becker, C. E. Copatti, B. Baldisserotto and J. Radünz Neto (2007). "Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings." Journal of the World Aquaculture Society **38**: 1-11.
Giari, L., B. S. Dezfuli, M. Lanzoni and G. Castaldelli (2012). "The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the Po River." Ecotoxicology and Environmental Safety **77**: 18-27.

Giguère, A., P. G. C. Campbell, L. Hare and C. Cossu-Leguille (2005). "Metal bioaccumulation and oxidative stress in yellow perch (*Perca flavescens*) collected from eight lakes along a metal contamination gradient (Cd, Cu, Zn, Ni)." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **62**(3): 563-577.
Giulio, R. T. and D. E. Hinton (2008). "The toxicology of fishes. CRC Press. Taylor and Francis Group."
Gomes, L. C., J. I. Golombieski, A. R. C. Gomes and B. Baldisserotto (2000). "Biology of *Rhamdia quelen* (TELEOSTEI, PIMELODIDAE)." Ciência Rural **30**(1): 179-185.
Handy, R. D. and W. S. Penrice (1993). "The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Comparative Biochemistry and Physiology **106C**(3): 111-124.
He, J., L. Fu, Y. Wang, J. J. Li, X. H. Wang, L. M. Su, L. X. Sheng and Y. H. Zhao (2014). "Investigation on baseline toxicity to rats based on aliphatic compounds and comparison with toxicity to fish: Effect of exposure routes on toxicity." Regulatory Toxicology and Pharmacology **70**(1): 98-106.
Heath, A. G. (1987). Water Pollution and Fish Physiology. Florida -USA.
Heath, A. G. (1995). Water Pollution and Fish Physiology. Flórida.
Hibiya, T. (1982). An atlas of fish histology: normal and pathological features. Tokyo, Kodansna.
Hinton, D. E., P. C. Baumann, G. R. Gardner, W. E. Hawkins, J. D. Hendricks, R. A. Murchelano and M. S. Okihiro (1992). Biomarkers biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress.
Hinton, D. E. and D. J. Lauren (1990). Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes potential bio-markers of exposure. In: McCarthy, J. F.. Shugart, L. R. (eds.) Biomarkers of environmental contamination.
Hodgson, E. and J. A. Goldstein (2001). Metabolism of toxicants: phase I reactions and pharmacogenetics.n: HODGSON, E. & SMART, R.C. (eds) Introduction to biochemical toxicology. . New York, Wiley-Intercience.
Hoffmann, S., A. Kinsner-Ovaskainen, P. Prieto, I. Mangelsdorf, C. Bieler and T. Cole (2010). "Acute oral toxicity: Variability, reliability, relevance and interspecies comparison of rodent LD50 data from literature surveyed for the ACuteTox project." Regulatory Toxicology and Pharmacology **58**(3): 395-407.
Horobin, R. W. and J. D. Brancoft (1998). Troubleshooting histology stains.
Hued, A. C., S. Oberhofer and M. A. Bistoni (2012). "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 **62**: 107-117.
Hunt, J. W. and B. S. Anderson (1989). "Sublethal effects of zinc and municipal effluents on larvae of the red abalone Haliotis rufescens." Marine Biology **101**(4): 545-552.
Jacob, J., N. J. Nandini and P. Natarajan (2012). "Histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in *Mystus gulio* (Hamilton)." Journal of Recent Trends Bioscience **2**: 10-17.

Jacob, J., N. J. Nandini and P. Natarajan (2012). "Histopathologic biomarkers as indicators of aquatic pollution in *Mystus gulio* (Hamilton)." J. Recent Trends Biosci., **2**(1): 10-17.
Jahanbakhshi, A. and A. Hedayati (2013). "Gill histopathological changes in Great sturgeon after exposure to crude and water soluble fraction of diesel oil." Comparative Clinical Pathology **22**: 1083–1086.
Jalaludeen, M. D., M. Arunachalam, M. Raja, S. Nandagopal, S. A. B., S. Sundar and D. Palanimuthu (2012). "histopathology of the gill, liver and kidney tissues of the freshwater fish *Tilapia mossambica* exposed to cadmium sulphate." I.J.A.B.R., **2**(4): 572-578.
Jiraungkoorskula, W., E. S. Upathama, B. M. Kruatrachuea, S. Sahaphongc, S. Vichasri-Gramsa and P. Pokethitiyooka (2002). "Histopathological effects of roundup, a glyphosate herbicide, on nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)." Science Asia **28**: 121-127.
Jobling, M. (1995). Osmotic and ionic regulation water and salt balance.
Johnson, L. L., C. M. Stehr, O. P. Olson, M. S. Myers, S. M. Pierce, C. A. Wigren, B. B. McCain and U. Varanasi (1993). "Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the United States." Environmental Science and Technology **27**(13): 2759-2771.
Jorge, R. A. D. L. V. C. and G. S. Moreira (2005). "Use of sodium dodecyl sulfate and zinc sulfate as reference substances for toxicity tests with the mussel Perna perna (Linnaeus, 1758) (Mollusca: Bivalvia)." Ecotoxicology and Environmental Safety **61**(2): 280-285.
Kakkar, P., R. Saxena, N. Rathee and M. Joshi (2011). "Water soluble fraction of diesel fuel induced histopathological alterations in the liver of *Channa punctatus*." Toxicology International **18**(1): 14-17.
Keluskar, R., A. Nerurkar and A. Desai (2013). "Development of a simultaneous partial nitrification, anaerobic ammonia oxidation and denitrification (SNAD) bench scale process for removal of ammonia from effluent of a fertilizer industry." Bioresource Technology **130**(0): 390-397.
Kennish, M. J. (1991). "Anthropogenic impacts on estuaries. Em: KENNISH, M.J. (ed). Ecology of Estuaries. Vol. 2. Biological Aspects CRC Press, Boca Raton:."
Khan, H. A., M. Sikdar-Bar, Kamlesh B, A. W. Adil and Pervaiz A. (2011). "Lead nitrate induced histopathological changes in the gills of the african catfish *Clarias batrachus*." Journal of Applied Sciences Research **7**(7): 1087-1092.
Khanna, D. R., P. Sarka, A. Gautam and R. Bhutiani (2007). "Fish scales as bio-indicator of water quality of River Ganga." Environmental Monitoring and Assessment **134**(1-3): 153-160.
Klein, S., A. Aldi Feiden, W. R. Boscolo, A. Reidel, A. Signor and A. A. Signor (2004). "Chemical products for *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) controll in surubim do Iguaçu *Steindachneridion* sp., Garavello (1991) Fingerlings." Semina: Ciências Agrárias **25**(1): 51-58.
Knoph, M. B. and K. Thorud (1996). "Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (Salmo salar L.) in seawater—Effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea

and glucose levels and hematologic parameters." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **113**(4): 375-381.
Kullander, S. O. (2003). Family Cichlidae (Cichlids). In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs,Porto Alegre.
Kumar, A., V. P. Kesari and P. K. Khan (2013). "Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment." Biometals **26**(2): 337-346.
Kumar, A., M. R. Prasad, K. Srivastava, S. Tripathi and A. K. Srivastav (2010). "Branchial histopathological study of catfish Heteropneustes fossilis following exposure to purified neem extract , Azadirachtin." World journal of zoology **5**(4): 239-243.
Lall, S. P. (2002). The Minerals. In: HALVER, John E.; HARDY, Ronald W. Fish Nutrition, Washingtown: Academic Press.
Langiano, V. C. and C. R. B. Martinez (2008). "Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus.*" Comparative Biochemistry and Physiology, Part C **147**: 222-231.
Langiano, V. C. and C. R. B. Martinez (2008). "Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus.*" Comparative Biochemistry and Physiology, Part C(147): 222-231.
Leasea, H. M., J. A. Hansen, H. L. Bergman and J. S. Meyerc (2003). "Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology **134**: 491-500.
Leonardo, J. M. L. O., L. Vargas, R. P. Ribeiro, H. L. M. Moreira, M. R. M. Natali, T. Volski and F. Cavichiolo (2001). "Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C." Acta Scientiarum **23**(4): 863-870.
Li, Z. H., J. Veliseka, V. Zlabeka, R. Grabic, J. Machova, J. Kolarova, P. Li and T. Randak (2011). "Chronic toxicity of verapamil on juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Effects on morphological indices, hematological parameters and antioxidant responses." Journal of Hazardous Materials **185**: 870–880.
Lim, C., P. H. Klesius, M. H. LI and E. H. Robinson (2000). "Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge." Aquaculture **185**: 313-327.
Ling, K. H., Y. M. Sin and T. J. Lam (1993). "Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (Carassius auratus)." Aquaculture **118**(1-2): 23-25.
Livingstone, D. R. (1993). "Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarker in the aquatic environment." Journal of chemical technology and biotecnology **57**: 195-211.
Luchini, L. M. (1988). "Produccion de “bagre negro” o "catfish sudamericano”. ." Revista Argentina de producción animal **8**(5): 433-439.
Lupi, C., N. I. Nhacarini, A. F. Mazon and O. R. Sá (2007). "Avaliação da poluição ambiental através de alterações morfológicas das brânquias de

*Oreochromis niloticu*s (tilápia) nos córregos Retiro, Consulta e Bebedouro, município de Bebedouro-SP." Revista Fafibe on line, **3**.
Luvizotto, M. F. (1994). Efeitos de diferentes salinidades sobre as células de cloreto e as células secretoras do epitélio branquial do peixe antártico *Notothenio*ps *nudifrons* (Lonberg,1906). Dissertação, Universidade Federal do Paraná.
Luz, R. K., R. M. Martínez-Álvarez, N. Pedro and D. M. J. Delgado (2008). "Growth, food intake regulation and metabolic adaptations in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to different salinities." Aquaculture **276**(0): 171 178.
Maceda-Veiga, A., M. Monroy, E. Navarro, G. Viscor and A. Sosto (2013). "Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river." Science of the Total Environment **449**: 9-19.
Maceina, M. J., F. G. Nordlie and J. V. Shireman (1980). "The influence of salinity on oxygen consumption and plasma electrolytes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* " Jpurnal of fish biology **16**(6): 613-619.
Mallatt, J. (1985). "Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. ." Canadian Journal of fisheries and aquatic sciences **42**: 630-648.
Marchand, M. J., J. C. Dyk, G. M. Pieterse, I. E. J. Barnhoorn and M. S. Bornman (2009). "Histopathological alterations in the liver of the Sharptooth Catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in south Africa." Environmental Toxicology **24**: 133-147.
Marchioro, M. I. (1997). Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) à variação de pH e salinidade da água de cultivo., Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
Marchioro, M. I. and B. Baldisserotto (1999). "Fry survival Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) to changes in water salinity." Ciência Rural **9**(0): 315-318.
Marcon, L., N. Bazzoli, A. H. Mounteer and L. A. Benjamin (2015). "Histological and histometric evaluation of the liver in *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae), exposed to different concentrations of an organochlorine insecticide." The Anatomical Record **298**: 1754-1764.
Martins, M. L. and N. G. Romero (1996). "Efectus del parasitismo sobre el tegido branquial en peces cultivados : Estudio parasitológico e histopatológico." Revista Brasileira de Zoologia **13**(2): 489-500.
Mataqueiro, M. I., L. S. O. Nakaghi, J. P. Souza, C. Cruz, G. H. Oliveira and E. C. Urbinati (2009). "Histopathological changes in the gill, liver and kidney of pacu (P*iaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) exposed to various concentrations of trichlorfon. ." journal of Applied Ichthyology **25**: 124-127.
McHugh, K. J., N. J. Smit, J. H. J. Van Vuren, J. C. Van Dyk, L. Bervoets, A. Covaci and V. Wepener (2011). "A histology-based fish health assessment of the tigerfish, *Hydrocynus vittatus* from a DDT-affected area." Physics and Chemistry of the Earth **36** 895-904.
Mela, M., I. C. Guiloski, H. B. Doria, M. A. F. Randi, C. A. O. Ribeiro, L. Pereira, A. C. Maraschi, V. Prodocimo, C. A. Freire and H. C. Silva de Assis (2013).

"Effects of the herbicide atrazinein neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)." Ecotoxicology and environmental safety(93): 13-21.
Mela, M., M. A. Randi, D. F. Ventura, C. E. Carvalho, E. Pelletier and C. A. O. Ribeiro (2007). "Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*." Ecotoxicoligal and environmental safety **68**: 426–435.
Melancon, M. J. (1995). Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. In Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton, G. A.; Jr.; Cairns, J., and Jr. editors. Handbook of ecotoxicology.
Meschiatti, A. J. and M. S. Arcifa (2009). "A review on the fishfauna of Mogi-Guaçu River basin: a century of studies." Acta limnológica brasiliense **21**(1): 135-159.
Miller, E. R. and C. B. Ammerman (1995). 8 - Iodine bioavailability. Bioavailability of Nutrients for Animals. C. B. A. H. B. J. Lewis. San Diego, Academic Press**:** 157-167.
Miron, D. S., Lenise V. F. S , J. I. Golombieski and B. Baldisserotto (2003). "Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis*-Infected Silver Catfish, *Rhamdia quele*n, Fingerlings." Journal of Applied Aquaculture **14**(1-2): 155-161.
Miron, D. S., B. Moraes, B. A. G., M. Crestani, R. Spanevello, V. Loro and B. Baldisserotto (2008). "Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae)." Aquaculture **277**: 192-196.
Monfared, A. L., A. M. Bahrami, E. Hosseini, S. Soltani and M. Shaddel (2015). "Effects of Nano-particles on Histo-pathological changes of the fish." Journal of Environmental Health Science & Engineering: 13:62.
Monteiro, S. M., J. M. Mancera, A. Fontaınhas-Fernandes and M. Sousa (2005). "Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. ." Comparative biochemical and physiology **141**: 375-383.
Monteiro, S. M., E. Rocha, A. Fontainhas-FernandesS and M. Sousa (2008). "Quantitative histopathology of *Oreochromis niloticus* gills after copper exposure." Journal of Fish Biology **73**: 1376-1392.
Montes, C. S., M. A. P. Ferrerira, S. S. D. Santos, E. I. C. F. Von Ledebur and R. Rocha (2010). "Branchial histopathological study of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Castelnau, 1855) in the Guajará bay, Belém, Pará state, Brazil." Acta Scientiarum Biological Sciences **32**(1): 93-99.
Moreira, H. L. M., L. Vargas, R. P. Ribero and S. Zimmermann (2001). Fundamentos da moderna agüicultura.
Mota, S. B., H. S. Henrique, R. M. Duarte, A. L. Val and V. M. F. A. Val (2015). "Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*." Chemosphere **135**: 53-60.
Mourente, G., J. E. Good, K. D. Thompson and J. G. Bell (2007). "Effects of partial substitution of dietary fish oil with blends of vegetable oils, on blood leucocyte fatty acid compositions, immune function and histology in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) " British Journal of Nutrition **98**: 770-777.

Mumford, S., J. Heidel, C. Smith, J. Morrison, B. MacConnell and V. Blazer (2007) "Fish histology and histopathology ", 357.
Muñoz, L., P. Weber, V. Dressler, B. Baldisserotto and F. A. Vigliano (2015). "Histopathological biomarkers in juvenile silver catfish (Rhamdia quelen) exposed to a sublethal lead concentration." Ecotoxicology and Environmental Safety **113**(0): 241-247.
Naigaga, I., H. Kaiser, W. J. Muller, L. Ojok, D. Mbabazi, G. Magezi and E. Muhumuzae (2011). "Fish as bioindicators in aquatic environmental pollution assessment: A case study in Lake Victoria wetlands, Uganda." Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C **36**(14-15): 918-928.
Nerici, C., A. Silva and G. Merino (2012). "Effect of two temperatures on ammonia excretion rates of Seriolella violacea (Palm fish) juveniles under rearing conditions." Aquacultural Engineering **46**(0): 47-52.
Neškovic, N. K., V. Poleksic, I. Elezovic, V. Karan and M. Budimir (1996). "Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp, *Cyprinus carpio* L. ." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **56**: 295-302.
Noga, E. J. (2010). Fish disease: diagnosis and treatment, 2 ed.
Nogueira, D. J., S. C. Castro and O. R. Sá (2008). "Avaliação da qualidade da água no reservatório UHE Furnas - MG, utilizando as brânquias de *Pimelodus maculatus* (LACÈPÉDE, 1803) como biomarcador de poluição ambiental." Ciência et Praxis **1**(1): 2008.
Ohta, I. and A. Ebisawa (2015). "Reproductive biology and spawning aggregation fishing of the white-streaked grouper, *Epinephelus ongus*, associated with seasonal and lunar cycles." Environmental biology of fishes **98**: 1555-1570.
Oliva, M., M. C. Garrido, D. S. Marquez and M. L. G. Canales (2009). "Sublethal and lethal toxicity in juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) exposed tocopper: A preliminary toxicity range-finding test." Experimental and toxicologic pathology **61**: 113–121.
Ong, E. S. and Z. B. Din (2001). "Cadmium, Copper, and Zinc Toxicity to the Clam, Donax faba C., and the Blood Cockle, Anadara granosa L." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **66**(1): 86-93.
Ostrensky, A., M. A. Marchiori and L. H. Poersch (1992). "Acute toxicity of ammonia in the production process of Post Larvae of *Penaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967." Anais da Academia Brasileira de Ciências **64**(4): 383-389.
Ostrensky, A., M. A. Marchiori and L. H. Poersch (1992). "Toxicidade Aguda da Amônia no Processo Produtivo de Pós-Larvas de P*enaeus paulensis* Pérez-Farfante, 1967." Anais da Academia Brasileira de Ciências **64**(4): 383-389.
Oyoo-Okoth, E., L. Cherop, C. C. Ngugi, V. Chepkirui-Boit, D. Manguya-Lusega, J. Ani-Sabwa and H. Charo-Karisa (2011). "Survival and physiological response of Labeo victorianus (Pisces: Cyprinidae, Boulenger 1901) juveniles to transport stress under a salinity gradient." Aquaculture **319**(1–2): 226-231.
Pádua, S. B., R. N. Menezes-Filho, J. Dias-Neto, G. T. Jerônimo, M. M. Ishikama and M. L. Martins (2012). "Ictiofitiriasis: Knowing the disease to develop strategies of control." Panorama da Aqüicultura.

Pádua, S. B., M. M. Shikawa, A. S. Ventura, G. T. Jerônimo, M. L. Martins and L. E. R. Tavares (2013). "Brazilian catfish parasitized by *Epistylis* sp. (Ciliophora, Epistylididae), with description of parasite intensity score." Parasitology research **112**: 443-446.

Pamplona, J. H., E. T. Oba, T. A. Silva, L. P. Ramos, W. A. Ramsdorf, M. M. Cestaric, C. A. Oliveira Ribeiro, A. R. Zampronio and H. C. S. Assis (2011). "Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*." 74 **3**.

Pavanelli, G. C., J. C. Eiras and R. M. Takemoto (1998). Doenças de peixes: profilaxia de peixes – profilaxia, diagnóstico e tratamento. Maringá: Eduem.

Pavanelli, G. C., J. C. Eiras and R. M. Takemoto (1998). Fish diseases: prophylaxis of fish - prevention, diagnosis and treatment.

Poleksic, V. and V. Mitrovic-Tutundzic (1994). Fish gills as a monitor of sublethalc and chronic effects of pollution. In: Müller, R., Lloyd, R. (Eds.), Sublethal and Chronic Effects of Pollutants on Freshwater Fish. Oxford, Fishing News Books.

Polettaa, G. L., A. Larriera, E. Kleinsorge and M. D. Mudry (2009). "Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis **672**(2): 95-102.

Rabitto, I. S., J. R. M. A. Costa, H. C. S. Assis, E. Pelletie, F. M. Akaishi, A. Anjos, M. A. F. Randi and C. A. O. Ribeiro (2005). "Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus:* histopathological and biochemical findings." Ecotoxicology and Environmental Safety **60**: 147-156.

Rajeshkumar, S., S. Sukumar and N. Munuswamy (2014). "Biomarkers of selected heavy metal toxicity and histology of *Chanos chanos* from Kaattuppalli Island, Chennai, southeast coast of India." Environmental Earth Science **72**: 207-219.

Ramos, I. P., A. P. Vidotto-Magnani and E. D. Carvalho (2008). "Influence of cage fish farming on the diet of dominant fish species of a Brazilian reservoir (Tiete river , high Paraná River basin)." Acta limnológica brasiliense **20**: 245-252.

Randall, D. J., W. Burggren and K. French (1999). Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações, 4ª Edição.

Randall, D. J. and T. K. N. Tsui (2002). "Ammonia toxicity in fish." Marine Pollution Bulletin **45**(1–12): 17-23.

Randall, D. J. and T. K. N. Tsui (2002). "Ammonia toxicity in fish." Mar. Poll. Bull **45**(17-23).

Randall, D. J. and T. K. N. Tsui (2002). "Ammonia toxicity in fish." Marine Pollution Bulletin **45**(17–23).

Rangel, C. F., A. C. S. Rosa and P. N. Sarcinelli (2011). "Use of pesticides and their implications for occupational exposure and environmental contamination." Cadernos Saúde Coletiva **19** (4): 435-443.

Resgalla Jr., C. and K. S. Laitano (2002). "Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no brasil." Notas Técnicas da Facimar **6**(153-163).

Robbins, S. and R. S. Cotran (2005). Patologia - Bases Patológicas das Doenças. In: Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N. .
Roberts, R. J. (2001). Fish Pathology. London, 3. ed.
Rudnicki, C. A. M., G. C. Melo, L. Donatti, H. G. Kawall and E. Fanta (2009). "Gills of juvenile fish *Piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sub-lethal contamination with the organophosphorus Azodrin®400." Brazilian archives of biology and technology **52**: 1431-1441.
Saha, N. and B. K. Ratha (1998). "Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints." Comp. Biochem. Physiol **120**(A): 195-208.
Salazar-Lugo, R., C. Mata, A. Oliveros, L. M. Rojas, M. Lemus and E. Rojas-Villarroel (2011). "Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomum* exposed to paraquat at different temperatures." Environmental Toxicology and Pharmacology **31**: 490-495.
Sampaio, F. G., C. L. Boijink , L. R. B. Santos, E. T. Oba, A. L. Kalinin and F. T. Rantin (2010). "The combined effect of copper and low pH on antioxidant defenses and biochemical parameters in neotropical fish pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)." Ecotoxicology **19**: 963–976.
Santos, D. M. S. (2010). Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão. . Doutorado em Medicina Veterinária - Patologia Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária - UNESP Jaboticabal.
Santos, D. M. S. (2010). Water quality and histopathology of organs from fish farms in the municipality of Itapecuru Mirim, Maranhão. Doctorate in Veterinary Medicine http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/pan/d/127.pdf, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences.
Santos, T. C. A., V. Gomes, M. J. A. C. R. Passos, A. J. S. Rocha, R. B. Salaroli and P. V. Ngan (2011). "Histopathological alterations in gills of juvenile Florida pompano *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae) following sublethal acute and chronic exposure to naphthalene." Pan-American Journal of Aquatic Sciences **6**(2): 109-120.
Saraiva, A., J. Costa, J. Serrão, C. Cruz and J. C. Eiras (2015). "A histology-based fish health assessment of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax* L.)." Aquaculture **448**: 375-381.
Saravanan, M., J. Y. Kim, H. N. Kim, S. B. Kim, D. H. Ko and J. H. Hur (2015). "Ecotoxicological impacts of isoprothiolane on freshwater fish *Cyprinus carpio* fingerlings: a multi-biomarker assessment " Journal of Applied Aquaculture **58**(4): 491–499.
Schnoor, J. L. (1996). Environmental modeling: fate and transport of pollutants in water, air, and soil. Department of Civil and Environmental Engineering. Iowa City, USA., University of Iowa.
Sens, D. R. (2009). Efeitos do triclorfom no crescimento e parâmetros hematológicos de tambaquis (*Colossoma macropomum*). Mestre, Universidade Federal doTocantins.
Shiogiri, N. S., M. G. Paulino, S. P. Carraschi, F. G. Baraldi, C. Cruz and M. N. Fernandes (2012). "Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the

gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*." Environmental toxicology and pharmacology **34**: 388–396.
Silfvergrip, A. M. C. (1996). A sistematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (Teleostei, Pimelodidae)
PhD Thesis, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology.
Silva, C. A., C. A. Oliveira-Ribeiro, A. Katsumiti, M. L. P. Araújo, E. M. Zandoná, G. P. Costa Silva, J. Maschio, H. Roche and H. C. SIilva de Assis (2009). "Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. ." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 400-409.
Song, L., M. G. Vijver, W. J. G. M. Peijnenburg, T. S. Galloway and C. R. Tyler (2015). "A comparative analysis on the in vivo toxicity of copper nanoparticles in three species of freshwater fish." Chemosphere **139**: 181-189.
Souza-Bastos, L. R. and C. A. Freire (2009). "The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*." Aquaculture **289**: 167-174.
Spencer, P., R. Pollock and M. Dubé (2008). "Effects of un-ionized ammonia on histological, endocrine, and whole organism endpoints in slimy sculpin (*Cottus cognatus*)." Aquatic Toxicology **90**: 300–309.
Tacchi, L., L. Lowrey, R. Musharrafieh, K. Crossey, E. T. Larragoite and I. Salinas (2015). "Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)." Aquaculture **435**(0): 120-127.
Takashima, F. and T. Hibiya (1995). An atlas of fish histology. Normal and pathogical features.
Teh, S. J., S. M. Adams and D. E. Hinton (1997). "Histopathologic biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to different types of contaminant stress." Aquatic Toxicology **37**(1): 51-70.
Terra, B. F. (2009). Variação da ictiofauna ao longo de um trecho longitudinal do sistema rio Paraíba do Sul - reservatório da UHE Do Funil e adaptação do índice de integridade biótica. Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Thomsom, R. G. (1983). Patologia geral veterinária. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
Thomson, R. G. (1978). Patologia geral veterinária.
Thophon, S., M. Kruatrachue, E. S. Upatham, P. Pokethitiyook, S. Sahaphong and S. Jaritkuan (2003). "Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. ." Environmental pollution. **121**: 307-320.
Thurston, R. V. and R. C. Russo (1983). "Acute toxicity of ammonia to rainbow trout." Transactions of the American Fisheries Society **112**: 696–704.
Tokumaru, M., H. Godinho and A. G. Ferri (1968). "Fresh water fish tissue fixation." Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo **7**(4): 841-848.
Tolosa, E. M. C., C. J. Rodrigues, O. A. Behmer and A. G. Freitas-Neto (2003). Manual de técnicas para histologia normal e patológica.
Tomasso, J. R. (1994). "Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals." Reviews in Fisheries Science **2**: 291–314.

Tonguthai, K. (1997). "Control of freshwater fish parasites: a Southeast Asian perspective." International Journal for Parasitology **27**(10): 1185-1191.
Troncoso, I. C., J. Cazenave, C. Bacchetta and M. A. Bistoni (2012). "Fish Physiol Biochem." Fish Physiol Biochem **38**: 693–702.
Trujillo-Jiménez, P., J. E. Sedeño-Díaz, J. A. Camargo and E. López-López (2011). "Assessing environmental conditions of the Río Champotón (México) using diverse indices and biomarkers in the fish *Astyanax aeneus* (Günther, 1860). ." Ecological Indicators **11**: 1636-1646.
USEPA (2002). Methods for mensuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, 5ª ed.
Valon, M., A. Valbona, E. Sula, G. Fahri, K. Dhurata and G. Fatmir (2013). "Histopathologic Biomarker of Fish Liver as Good Bioindicator of Water Pollution in Sitnica River, Kosovo." Global Journal of Science Frontier Research Agriculture and Veterinary **13**(5): 40-44.
Van Der Oost R., J. Beyer and N. P. E. Vermeulen (2003). "Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review." Environmental Toxicology and Pharmacology **13**: 57-149.
Velmurugan, B., M. Selvanayagam, E. P. Cengiz and E. Unlu (2009). "Histopathological Changes in the Gill and Liver Tissues of Freshwater Fish, *Cirrhinus mrigala* Exposed to Dichlorvos." Brazilian archives of biology and technology **52**(5): 1291-1296.
Viana, A. P., F. L. Frédou, C. S. Montes and R. M. Rocha (2013). "Fish histopathology and catalase activity as biomarkers of the environmental quality of the industrial district on the Amazon estuary, Brazil." Acta Scientiarum **35**(3): 395-401.
Vieira, D. B. and O. A. Shibatta (2007). "Peixes como indicadores da qualidade ambiental do ribeirão Esperança, município de Londrina, Paraná, Brasil." Biota Neotropica **7**(1): 57-65.
Wang, J.-Q., H. Lui, H. Po and L. Fan (1997). "Influence of salinity on food consumption, growth and energy conversion efficiency of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings." Aquaculture **148**(2-3): 115-124.
Wang, Y. and P. J. Walsh (2000). "High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen)." Aquatic Toxicology **50**: 205-219.
Wangen, K. B. S. (2012). "Therapeutic review: sodium chloride." Journal of Exotic Pet Medicine **21**: 94-98.
Wendelaar Bonga, S. E. (1997). "The stress response in fish." Physiological Reviews **77**(3): 591-625.
Wilkie, M. P. (1997). "Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology **118**(1): 39-50.
Wilkie, M. P., J. A. W. Stecyk, C. S. Couturier, S. Sidhu, G. K. Sandvik and G. E. Nilsson (2015). "Reversible brain swelling in crucian carp (Carassius carassius) and goldfish (Carassius auratus) in response to high external ammonia and anoxia." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **184**(0): 65-75.

Winkaler, E. U., A. G. Silva, H. C. Galindo and C. B. R. Martinez (2001). "Histological and physiological biomarkers to monitor the health of streams of fish Londrina, Paraná State." Acta Scientiarum **3**(2): 507-514.
Woo, P. T. K. (2006). Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections. University of Guelph Canada.
Wright, P. A. and C. M. Wood (2012). "Seven things fish know about ammonia and we don't." Respiratory Physiology & Neurobiology **184**(3): 231-240.
Wurts, W. A. and R. M. Durborow (1992). "Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds." Southern Regional Aquaculture Center **464**: 1-4.
Xu, D. H., C. A. Shoemaker and P. H. Klesius (2012). "*Ichthyophthirius multifiliis* as a potential vector of Edwardsiellaictaluri in channel catfish." FEMS Microbiology letters **329**: 160-167.
Zuanon, Z. A. S., A. L. Salaro, G. C. Veras, M. M. Tavares and W. Chaves (2009). "Tolerância aguda e crônica de adultos de beta, *Betta splendens* , à salinidade da água." Revista brasileira de zootecnia **38**(11): 2106-2110.

Considerações finais

Os peixes infestados pelo parasito *Ichthyophthirius multifiliis* não apresentaram alterações brânquias que pudessem estar relacionadas à presença do parasito. O mesmo ocorreu para peixes expostos ao sal iodado.

Quando os peixes foram expostos à amônia foi observado, para exemplares de *M. maculatus*, um aumento do IIBr em função do aumento da concentração de amônia para a hiperplasia epitelial. Para *R. quelen* o mesmo foi observado para congestão. Também foi observado que diferentes alterações branquiais e hepáticas foram diagnosticadas para cada uma das espécies mesmo estas sendo submetidas às mesmas condições laboratoriais e de exposição ao xenobiótico (sal ou amônia). O surgimento das alterações teciduais, portanto, foi distinto para as diferentes espécies utilizadas. A existência de diferenças entre as espécies poderiam estar relacionadas às diferenças anatômicas branquiais e hepáticas existentes entre elas.

No presente estudo inúmeras foram as alterações observadas nos animais do controle mostrando que não apenas os xenobióticos testados estavam propiciando o desenvolvimento de alterações teciduais branquiais e hepáticas nos peixes. Sendo assim condições laboratoriais consideradas normais, assim como as condições de manejo podem ter propiciado o surgimento de tais alterações. Este é um grande empecilho no uso desta metodologia.

Nos três capítulos de experimentação laboratorial foram observadas discrepâncias relacionadas aos danos branquiais das diferentes espécies.

Estas diferenças podem ser causadas pelas diferentes abordagens utilizadas pelos três índices estudados ou pelas diferenças apresentadas pelas espécies analisadas.

No presente estudo os índices histopatológicos quantitativos não permitiram determinar a intensidade dos danos teciduais branquiais de acordo com o desenvolvimento da doença ou proporcionalmente às concentrações de xenobióticos testadas.

Por fim conclui-se que a histopatológica por microscopia de luz não é uma ferramenta especifica para o agente estressor usado. Esta metodologia não é especifica visto que pode sofrer interferência da metodologia utilizada (densidade, número de animais por unidade experimental, período experimental), espécie utilizada assim como da metodologia de análise tecidual.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Pós Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado da aluna Thayzi de Oliveira Zeni. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa produtividade em pesquisa do professor Antonio Ostrensky Neto.