

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIRCELEI SPONCHIADO

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NAS BRÂNQUIAS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL

PALOTINA, PR

2016

DIRCELEI SPONCHIADO

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NAS BRÂNQUIAS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, área de concentração Produção de organismos aquáticos, Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Paraná - Setor Palotina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luís Cupertino Ballester

Coorientador: Prof. Dr. Milton Rönnau

PALOTINA, PR

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S763 Sponchiado, Dircelei
Alterações histológicas nas branquias do Camarão-da-
Amazônia *Macrobrachium Amazonicum* submetidos a diferentes
concentrações de amônia total.
/ Dircelei Sponchiado. – Palotina, 2016
33f.

Orientador: Eduardo Luís Cupertino Ballester
Coorientador: Milton Rönnau .
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná,
Setor Palotina, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura
e Desenvolvimento Sustentável.

1. Aquicultura. 2. Carcinicultura .3. Toxicidade.
I. Ballester, Eduardo Luis Cupertino .II. , Rönnau ,Milton.
III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDU 639.3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
Código CAPES: 40001016078P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DIRCELEI SPONCHIADO**, intitulada: **"ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS NAS BRÂNKIAS DO CAMARÃO-DA-AMAZÔNIA MACROBRACHIUM AMAZONICUM SUBMETIDOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL"**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação-----.

Palotina, 09 de Dezembro de 2016.

EDUARDO LUIS CUPERTINO BALLESTER
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

ALINE DE MARCO VIOTT
Avaliador Externo (UFPR)

LEANDRO PORTZ
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me proporcionar uma vaga abençoada, como sempre desejei.

Ao meu grandioso marido Rafael Itamar da Silva, meu tudo!

A minha filha linda Izabella Sponchiado Alves, uma inspiração para nunca desistir.

Aos meus pais, Irene Sponchiado e Moacir Rubens Sponchiado (*in memoriam*), que são exemplo de honestidade para as conquistas dos meus ideais.

Aos meus irmãos, Volmir Sponchiado e Raquel Silva Lacerda, Adilson Sponchiado e Marceline De Carli Sponchiado, Dirlene Sponchiado e Sandro Nascimento, que são modelos de persistência e de grandes conquistas, cada um nos seus objetivos.

A minha sogra Veri e meu sogro Romeu (tão sábio na sua simplicidade), e meus cunhados (a) por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Luis Cupertino Ballester, que acreditou em mim, uma pessoa a mais que aprendi admirar e ser modelo de ser humano e com suas experiências deixará um legado que contribuirá para a Ciência.

Ao Prof. Dr. Milton Rönnau, meu amigo e também um modelo de homem decente.

Ao Mestre Fabrício Dutra e sua equipe, pela ideia do experimento, pela desenvoltura nas análises das lâminas, com a estatística e por este jeito doce de trabalhar, mais uma pessoa que aprendi admirar.

Aos colegas do laboratório que tornaram meus dias menos tediosos e com muita alegria.

Anderson Jose de Sousa, agradeço pela paciência e agilidade na configuração das imagens.

Aos meus amigos do dia-dia que sempre me incentivaram há não deixar a peteca cair, muito obrigada por fazerem parte da minha vida!

A Universidade Federal do Paraná e o Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, na pessoa de Margarida, Elisângela a Mari pela amizade, pelo suporte administrativo, pela infraestrutura, conhecimentos adquiridos para a realização deste trabalho.

Aos órgãos financiadores CNPq, FINEP e MEC-Proext.

Ao laboratório de Carcinicultura da UNESP Jaboticabal - SP pela doação de pós-larvas.

Aos membros da banca por terem aceitado o convite e pelas valiosas contribuições que farão para um trabalho de maior qualidade.

*“Quando a injustiça se torna lei, a
resistência torna-se um dever”.*

(Thomas Jefferson)

RESUMO

A aquicultura tem sido responsável pelo crescimento no fornecimento de pescado para consumo humano, e atualmente é uma atividade em ascensão. Entre as atividades de aquicultura, a carcinicultura de água doce ocupa lugar de destaque devido ao alto valor deste produto. O uso de espécies nativas na aquicultura vem sendo um requisito importante para a sustentabilidade e o desenvolvimento de sistemas de produção que causem menor impacto ao meio ambiente. No Brasil a espécie nativa de camarão de água doce com maior potencial para produção é o *Macrobrachium amazonicum*. Para que seja possível sua produção em cativeiro é necessário que as condições químicas e físicas da água estejam em equilíbrio, condições estas que podem ser rapidamente alteradas, em virtude da entrada exógena de nutrientes. A amônia é um composto nitrogenado comprovadamente tóxico, e que pode causar danos aos sistemas de produção. As brânquias são órgãos multifuncionais que estão em contato direto com o ambiente, constituindo o local de ligação e de depuração de contaminantes. As alterações causadas à estrutura branquial afetam diretamente os camarões. Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar alterações nas brânquias de juvenis de *M. amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de amônia total. Os camarões foram expostos a seis diferentes concentrações de amônia total (0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg.L⁻¹), com quatro repetições em um ensaio de curta duração (96 horas). Após a exposição às brânquias foram dissecadas, fixadas em uma solução de ALFAC, processadas rotineiramente pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H.E), os cortes histológicos foram avaliados em microscópio óptico. As lesões observadas foram tumefação celular, infiltração de hemócitos, tumefação celular, espessamento e descamação da cutícula lamelar, necrose, fusão lamelar e hiperplasia e edema. Através dos índices de órgãos (*Iorg*) observou-se que quanto maior a concentração maior foi o dano causado a estrutura branquial, tendo os tratamentos de 0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg.L⁻¹ de amônia total, índices de órgão 3,7±1,9; 10,7±2,1; 17,3±2,9; 33,3±7,8; 34,0±6 e 50,5±6,1, respectivamente. Observou-se mortalidade de 100% dos animais no tratamento 80mg.L⁻¹ de amônia total em 48 horas, para 40mg.L⁻¹ ocorreu também 100% de mortalidade em 72horas. Na concentração 20mg.L⁻¹ os animais foram a óbito em 96 horas apresentando mortalidade média de 48%. As concentrações de 10 e 5 mg.L⁻¹ apresentaram para 96 horas 10% de mortalidade. No grupo controle ocorreram 6% de mortalidade em 96 horas. Os resultados demonstraram que as brânquias de *M. amazonicum* sofreram alterações devido à exposição a níveis crescentes de amônia e que estas alterações foram agravadas pelo aumento da concentração e do tempo de exposição ao composto tóxico.

Palavras-chave: Aquicultura, carcinicultura, toxicidade.

ABSTRACT

Aquaculture has been responsible for growth in the supply of fish for human consumption, and is currently a rising activity. Among aquaculture activities, fresh water prawn farming occupies a prominent place due to the high value of this product. The use of native species in aquaculture has become an important requirement for the sustainability and development of production systems that cause less impact to the environment. In Brazil the species with the greatest potential for production is *Macrobrachium amazonicum*. However, to achieve good production results, chemical and physical conditions of water must be in equilibrium. Ammonia is a toxic nitrogen compound that may cause damage to production systems. The gills are multifunctional organs that are in direct contact with the environment, constituting the place of connection and purification of contaminants. Changes to the branchial structure directly affect the prawns. Therefore, the objective of this work was to verify changes in the gills of juveniles *M. amazonicum* submitted to different concentrations of total ammonia. Prawns were exposed to six different concentrations of total ammonia (0, 5, 10, 20, 40 and 80 mg.L⁻¹), with 4 replicates per treatment in a short-term test (96 hours). The prawn after their death and at the end of the experimental period were collected for the dissection of the gills to perform the traditional protocol for the assembly of histological slides with the technique of eosin and hematoxylin (HE) staining, and it was later analyzed by microscopy optics with image capture. Gill analyzes revealed the following histological changes: cellular swelling, hemocyte infiltration, lamellar cuticle thickening and desquamation, necrosis, lamellar fusion and hyperplasia and edema. Through the organ indexes (*Iorg*), it was possible to observe that the higher the concentration, the greater the damage caused to the gill structure, and the treatments of 0, 5, 10, 20, 40 and 80 mg.L⁻¹ of total ammonia nitrogen showed *Iorg* of 3.7±1.9; 10.7±2.1; 17.3±2.9; 33.3±7.8; 34.0±6 and 50.5±6.1, respectively. The results demonstrated that the gills of *M. amazonicum* were altered due to exposure to increasing levels of ammonia and that these alterations were aggravated by the increased concentration and time of exposure to the toxic compound.

Keywords: Aquaculture, shrimp farming, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - JUVENIL DE <i>MACROBRACHIUM AMAZONICUM</i>	14
FIGURA 2 - CEFALOTÓRAX DE CAMARÃO <i>MACROBRACHIUM AMAZONICUM</i> . A) VISTA GERAL DO CEFALOTÓRAX ONDE JÁ SE EVIDENCIA PARTE DAS BRÂNQUIAS B) DETALHES DAS BRÂNQUIAS EM ESTEREMICROSCÓPIO	15
FIGURA 3 - MORTALIDADE MEDIA (\pm DP) OBSERVADA PARA JUVENIL DE <i>M. AMAZONICUM</i> EXPOSTO À AMÔNIA DURANTE 96 HORAS DE TESTE	18
FIGURA 4 - BRÂNQUIA DE <i>M. AMAZONICUM</i> EXPOSTO A 0 MG.L ⁻¹ DE AMÔNIA (CONTROLE). ESPAÇO HEMOCÍTICO (ES); LAMELA (L); HEMÓCITO (H); ESPAÇO INTER LAMELAR (EIL) E INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITOS (IH) (20X, H&E). B) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 5 MG.L ⁻¹ DE AMÔNIA. TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO HEMÓCITOS (IH); ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL) E DESCAMAÇÃO DA CUTÍCULA LAMELAR (DCL). C) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 10 MG.L ⁻¹ DE AMÔNIA. CÉLULAS PILARES (CP); NECROSE (N) E INFILTRAÇÃO HEMÓCITOS (IH) (20X, H&E). D) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 20 MG.L ⁻¹ DE AMÔNIA. TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITOS (IH); FUSÃO LAMELAR (FL); ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL) E DESCAMAÇÃO DA CUTÍCULA LAMELAR (20X, H&E). E) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 40 MG.L ⁻¹ DE AMÔNIA. NECROSE (N); TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITO (IH) E ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL) (20X, H&E). F) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 80 MG.L ⁻¹ DE AMÔNIA. NECROSE (N); HIPERPLASIA (HP); FUSÃO LAMELAR (FL); DESCAMAÇÃO DA CUTÍCULA LAMELAR (DCL); ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL), TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITOS E EDEMA (10X, H&E).....	20
FIGURA 5 - ÍNDICE DO ÓRGÃO (MÉDIA \pm D.P) DE JUVENIS DE <i>MACROBRACHIUM AMAZONICUM</i> EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL DURANTE 96 HORAS	21

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE LESÕES PARA CRUSTÁCEOS, ADAPTADO DE BERNET ET AL. (1999).....	16
TABELA 2 – MÉDIA (\pm DP) DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA MONITORADOS DURANTE O EXPERIMENTO REALIZADO COM JUVENIS DE <i>MACROBRACHIUM AMAZONICUM</i> EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL.	17

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	14
2.1	DELINEAMENTOS EXPERIMENTAL.....	14
2.2	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS.....	15
2.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	16
3	RESULTADOS	17
4	DISCUSSÃO	22
5	CONCLUSÃO	28

1 INTRODUÇÃO

A aquicultura tem sido responsável pelo crescimento no fornecimento de pescado para consumo humano, sendo atividade que está em ascensão devido ao aumento da população, aumento da renda e urbanização. O comércio internacional tem fornecido escolhas mais amplas favorecendo o consumo de aproximadamente 20 kg de pescado por pessoa por ano no mundo em 2014 e 2015 (FAO, 2016). Entre as atividades de aquicultura, a carcinicultura ocupa lugar de destaque devido ao alto valor deste produto. A produção mundial de carcinicultura de água doce movimentou cerca de US\$ 2,6 bilhões no ano de 2014 com comercialização de aproximadamente 500.000 toneladas de camarões (FAO, 2016).

Até o ano de 2009, a principal espécie de camarão de água doce produzida em cativeiro era o *Macrobrachium rosenbergii*, entretanto, a partir de 2010 o *Macrobrachium nipponense*, uma espécie nativa da China e produzida apenas naquele país, superou a produção de *M. rosenbergii*. Em 2014, foram produzidas 257.641 toneladas de *M. nipponense* e os registros de produção de *M. rosenbergii* foram de 216.857 toneladas (FAO, 2016). Estes números reforçam a importância de desenvolvimento de pesquisas para a produção de espécies nativas para o desenvolvimento de sistemas de produção que causem menor impacto ao meio ambiente e reduzam os riscos de introdução de espécies exóticas (VITULE, 2009; IKETANI et al. 2016)

No Brasil a espécie nativa com maior potencial para produção em cativeiro é o *Macrobrachium amazonicum* (MORAES-VALENTI; VALENTI, 2010; MARQUES; MORAES-VALENTI, 2012). Além disso, é o principal camarão de água-doce explorado comercialmente nos estados do Pará e Amapá pela pesca artesanal, onde apresenta uma comercialização significativa (LUCENA-FRÉDOU et al. 2010). O *M. amazonicum* apresenta crescimento rápido (KUTTY et al. 2000), fácil reprodução, e outras características favoráveis para a produção, como rusticidade e adaptabilidade ao sistema de produção em cativeiro (ARAUJO; VALENTI, 2011) podendo atingir peso de 30 g e comprimento de 16 cm (MORAES-VALENTI; VALENTI, 2010).

A produção de camarões em cativeiro está diretamente relacionada com as condições físicas e químicas da água (URBINATI; CARNEIRO, 2004), que podem ser rapidamente alteradas, em virtude da entrada exógena de nutrientes no sistema de produção (ARANA, 2010), essas alterações ambientais podem influenciando no crescimento, na alimentação, sobrevivência e na susceptibilidade a parasitos (KIR et al. 2004; MUGNIER; JUSTONS, 2004), podendo levar a maior mortalidade de animais (URBINATI; CARNEIRO, 2004;

BALDISSEROTTO, 2011). Dentre os parâmetros de qualidade de água, a amônia é um dos compostos que mais afeta o sistema produtivo aquícola devido a rápida capacidade de chegar a concentrações tóxicas (URBINATI; CARNEIRO, 2004; DUTRA et al. 2016).

Estudos toxicológicos através de testes de letalidade (CL_{50}) são recomendados para o fornecimento de informações básicas sobre os efeitos tóxicos de uma substância a um organismo vivo e para determinação dos níveis de segurança adequados para sua produção (IBAMA, 2009), Porém os testes de letalidade não fornecem informações sobre os possíveis danos provocados ao organismo devido à intoxicação. Assim, a histopatologia é uma ferramenta comumente utilizada na identificação dos danos teciduais provocados ao organismo submetido a um agente tóxico (MIRON et al. 2008). Embora alguns estudos com análises histológicas tenham avaliado o efeito causado às brânquias de camarões por pesticidas (LIGNOT et al. 1997; SARAVANA et al. 2000), metais pesados (ASIH et al. 2013; BEN-KHEDHER et al. 2014), vírus (PAZIR et al. 2011; YUN et al. 2014) e irradiação gama Cobalto-60 (STALIN et al. 2013) pouco se sabe sobre os danos dos compostos nitrogenados nas brânquias do camarão.

As brânquias são órgãos multifuncionais que atuam entre o animal e o ambiente, constituindo o local de ligação e depuração de contaminantes (EVANS et al. 2005; HENRY et al. 2012). As alterações causadas à estrutura branquial dos organismos aquáticos afetam diretamente os mecanismos de respiração e osmorregulação (MARTINEZ; CÓLUS, 2002; USMAN et al. 2013). Trabalhos realizados com brânquias de peixes mostraram que este órgão é afetado pela amônia, apresentando lesão e alteração da sua estrutura (ARANA, 1997; SARAVANA BHAVAN; GERALDINE, 2000). Em lesão incluem espessamento epitelial (PEYGHAN; TAKAMI, 2002); hiperplasia do epitélio branquial e fusão das lamelas (KARASU; KÖKSAL 2005). Lesões histológicas foram relatadas em diferentes espécies de camarões com metais pesados, parasiticida e radiação (LI et al. 2007; KAOUD; REZK, 2011; SOEGIANTO et al. 2013; CHANG et al. 2006; STALIN et al. 2013).

Dentro deste contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos causados a estrutura branquial de juvenis de *M. amazonicum*, submetidos a diferentes concentrações de amônia total.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O Trabalho foi realizado no Laboratório de Carcinicultura e as análises histológicas processadas no Laboratório de Histopatologia, ambos da Universidade Federal do Paraná UFPR – Setor Palotina.

2.1 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAL

No bioensaio foram utilizados 240 juvenis de *M. amazonicum*, (Figura 1) com peso úmido de $2,07 \pm 0,62$ g e comprimento total $6,29 \pm 0,71$ cm (Média \pm D.P.), distribuídos em 24 aquários de 10 litros (n=10), com aeração forçada e densidade de um indivíduo por litro, sem renovação de água, ocorreu no mês de fevereiro Os animais não foram alimentados durante o período experimental, para não ocorrer influencia na excreta dos animais. O delineamento foi inteiramente casualizado, composto por seis tratamentos correspondentes às concentrações de amônia total (0, 5, 10, 20, 40 e 80 mg.L⁻¹) e quatro repetições por tratamento. As concentrações foram estabelecidas a partir de uma solução padrão de cloreto de amônia de 1000 mg.L⁻¹ marca *synth*, para a preparação da solução estoque de amônia foram pesados 3,819 g de cloreto de amônio e diluídos em 1 litro de água destilada, as diluições nos aquários ocorreram de acordo com as concentrações estipuladas.

FIGURA 1 - JUVENIL DE *MACROBRACHIUM AMAZONICUM*



FONTE: O autor (2016).

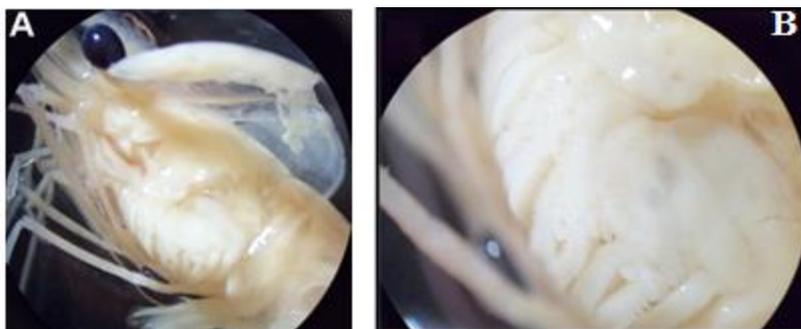
As variáveis limnológicas, oxigênio dissolvido (oxímetro, Hanna HI 9146), temperatura (termômetro digital Incoterm) e pH (pHmetro, Tekna T-100) foram aferidos diariamente no período da manhã. No início e fim do experimento foram realizadas as análises de alcalinidade, dureza, nitrito e nitrato e amônia conforme metodologia descrita em Apha (2005). A amônia foi mensurada no início e ao final do experimento em cada tratamento para convalidar a concentração inicial da solução.

A morte dos camarões foi determinada pela ausência de movimento e/ou resposta a estímulos mecânicos. Os indivíduos foram observados a cada hora, durante as oito primeiras horas, após esse período até o término do experimento as observações foram realizadas a cada 12 horas.

2.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS BRÂNQUIAS

Para análise histológica das brânquias foram coletados os juvenis recém-mortos e os sobreviventes foram anestesiados com óleo de cravo, sendo eutanasiados e seu cefalotórax seccionado e fixado em ALFAC (BELL e LIGHTNER,1998) por 48 horas. Após, as brânquias foram retiradas do cefalotórax e fixadas em álcool 70% (Figura 2).

FIGURA 2 - CEFALOTÓRAX DE CAMARÃO *MACROBRACHIUM AMAZONICUM*. A) VISTA GERAL DO CEFALOTÓRAX ONDE JÁ SE EVIDENCIA PARTE DAS BRÂNQUIAS B) DETALHES DAS BRÂNQUIAS EM ESTEREMICROSCÓPIO



FONTE: DUTRA (2016).

Para a confecção das lâminas histológicas, foram utilizadas as brânquias de três indivíduos de cada repetição. As brânquias foram acomodadas em cassetes com papel filtro e desidratadas em uma série crescente de álcoois (70%, 80%, 90% e absoluto), diafanizados em xilol (três banhos) e impregnados em parafina histológica a 56°C, ambos com duração de 40 minutos. Após a inclusão foram realizados cortes com o auxílio de um micrótomo (Leica, modelo RM2245) em espessura 5µm e então coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). As imagens das brânquias foram capturadas com uma câmera digital 2048x15636 megapixels (Leica, modelo DFC295) acoplada em microscópio (Leica, modelo DM1000) e visualizada pelo software Leica Application Suite V3, (Leica, modelo LAS V3.8).

As alterações nas brânquias foram avaliadas de acordo com o Índice do Órgão (*Iorg.*) (BERNET et al. 1999) adaptada para camarões conforme Costa et al. (2013). As alterações foram classificadas de acordo com o tipo padrão de reação de 1 a 4, sendo atribuído para cada

alteração um fator de importância (w) de acordo com o grau de reversibilidade, onde: “1” = alterações facilmente reversíveis; “2” = alterações moderadas, reversíveis com o fim da exposição e “3” = alterações irreversíveis, apresentando perda parcial ou total da função do órgão. O valor de pontuação (a) foi aplicado de acordo com o grau de distribuição e intensidade da lesão do órgão, onde: "0" = ausência; "1-2" = ocorrência leve; "3-4" = ocorrência moderada e "5-6" = ocorrência acentuada (Tabela 1).

A partir das classificações acima foi calculado o Índice do Órgão ($Iorg$):

$$Iorg = \sum_{alt} (a \cdot w)$$

Onde: “ $Iorg$ ” = índice do Órgão; “ alt ” = alteração, “ a ” = valor de pontuação e “ w ” = fator de importância. O índice representa o grau de lesão dos órgãos, sendo que um valor elevado do índice representa um elevado grau de lesão do órgão.

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DE LESÕES PARA CRUSTÁCEOS, ADAPTADO DE BERNET ET AL. (1999)

Padrão de reação	Características da reação	Descrição	Alteração	Fator de Importância (w)
1	Distúrbios hemocítico	Condição patológica do fluxo da hemolinfa e fluidos dos tecidos.	Aglomerção de hemócitos	1
2	Danos regressivos	Condição patológica que apresenta redução funcional ou perda de um órgão e/ou estrutura.	Inchaço lamelar (tumefação celular)	1
			Espessamento do epitélio lamelar	1
			Fusão lamelar	2
			Edema	2
			Necrose	3
Descamação da cutícula lamelar	3			
3	Danos progressivos	Condição patológica causando aumento da atividade celular e/ou do tecido.	Hiperplasia	2
4	Inflamação	Fluido intersticial contendo alta concentração de proteínas e restos celulares que vão além dos vasos da hemolinfa.	Infiltração de hemócitos	2

2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados Índice do Órgão ($Iorg$) foram submetidos verificação da normalidade de distribuição dos dados e homogeneidade das variâncias (SOKAL E ROHLF, 1969). Depois de confirmados estes pressupostos, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de uma via, sendo aplicado posteriormente o teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

3 RESULTADOS

Durante o período experimental de 96 horas, a temperatura da água variou de 24,9 a 25,5°C, o oxigênio dissolvido de 5,6 a 7,2 mg.L⁻¹, o pH de 7,7 a 8, a alcalinidade de 19,2 a 27,7mg.L⁻¹ de CaCO₃ e a dureza de 23,6 a 50,5 mg.L⁻¹ de CaCO₃. Os valores da amônia se mantiveram próximos às concentrações estabelecidas durante todo o experimento (Tabela 2).

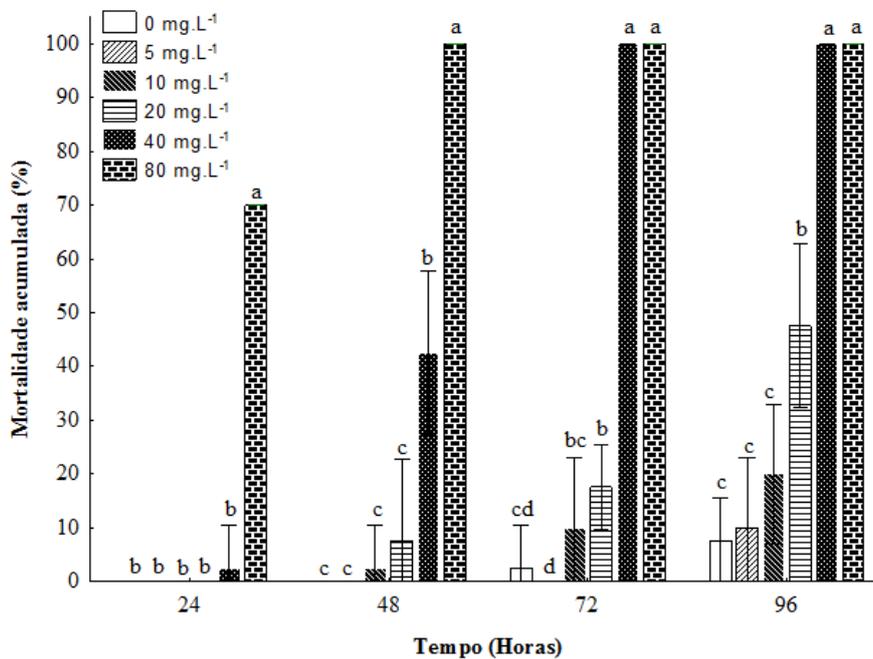
TABELA 2 – MÉDIA (± DP) DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DA ÁGUA MONITORADOS DURANTE O EXPERIMENTO REALIZADO COM JUVENIS DE *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL.

Variáveis/tratamento	Amônia total no experimento com juvenis					
	0 mg.L ⁻¹	5 mg.L ⁻¹	10 mg.L ⁻¹	20 mg.L ⁻¹	40 mg.L ⁻¹	80 mg.L ⁻¹
Temperatura H ₂ O (°C)	25.0±0.1	25.1±0.3	25.2±0.3	25.2±0.2	25.0±0.1	25.1±0.1
Oxigênio dissolvido (mg.L ⁻¹)	6.6±0.4	6.5±0.4	6.6±0.4	6.5±0.4	6.2±0.6	6.6±0.3
pH	7.8±0.1	7.8±0.1	7.8±0.2	7.8±0.1	7.8±0.1	7.8±0.1
Alcalinidade (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	24.5±1.1	25.8±1.9	24.7±1.2	22.8±2.1	21.7±1.0	20.5±1.3
Dureza (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	37.6±7.0	45.5±5.0	44.1±9.6	35.3±11.7	37.9±6.4	43.3±9.8
Amônia total (mg.L ⁻¹)	0.404±0.117	5.377±0.239	10.039±0.114	20.402±0.586	40.870±0.434	80.254±0.845
Amônia não ionizada (mg.L ⁻¹)	0.015±0.004	0.206±0.024	0.331±0.078	0.722±0.060	1.424±0.138	2.869±0.207
Nitrito (mg.L ⁻¹)	0.034±0.001	0.040±0.006	0.054±0.015	0.060±0.022	0.035±0.001	0.045±0.011
Nitrato (mg.L ⁻¹)	5.10 ⁻⁶ ±4.10 ⁻⁶	6.10 ⁻⁶ ±5.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁶ ±4.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁶ ±9.10 ⁻⁷	5.10 ⁻⁷ ±1.10 ⁻⁷	1.10 ⁻⁶ ±4.10 ⁻⁷

No presente estudo os registros dos efeitos degenerativos provocados à estrutura da brânquia foram observados com o aumento da concentração de amônia, incluindo tumefação celular, infiltração hemocítica, fusão lamelar, espessamento do epitélio lamelar, necrose, hiperplasia e descamação da cutícula lamelar e edema. As observações histopatológicas das brânquias dos juvenis de *M. amazonicum* foram realizadas entre o controle e as diferentes concentrações de amônia avaliadas (Figura 3).

São observados mortalidade de 100% dos animais no tratamento 80mg.L⁻¹ de amônia total em 48 horas, para 40mg.L⁻¹ ocorreu também 100% de mortalidade em 72 horas. Na concentração 20mg.L⁻¹ os animais foram a óbito em 96 horas apresentando mortalidade média de 48%. As concentrações de 10 e 5 mg.L⁻¹ apresentaram para 96 horas 10% de mortalidade. No grupo controle ocorreram 6% de mortalidade em 96 horas.

FIGURA 3 - MORTALIDADE MEDIA (\pm DP) OBSERVADA PARA JUVENIL DE *M. AMAZONICUM* EXPOSTO À AMÔNIA DURANTE 96 HORAS DE TESTE

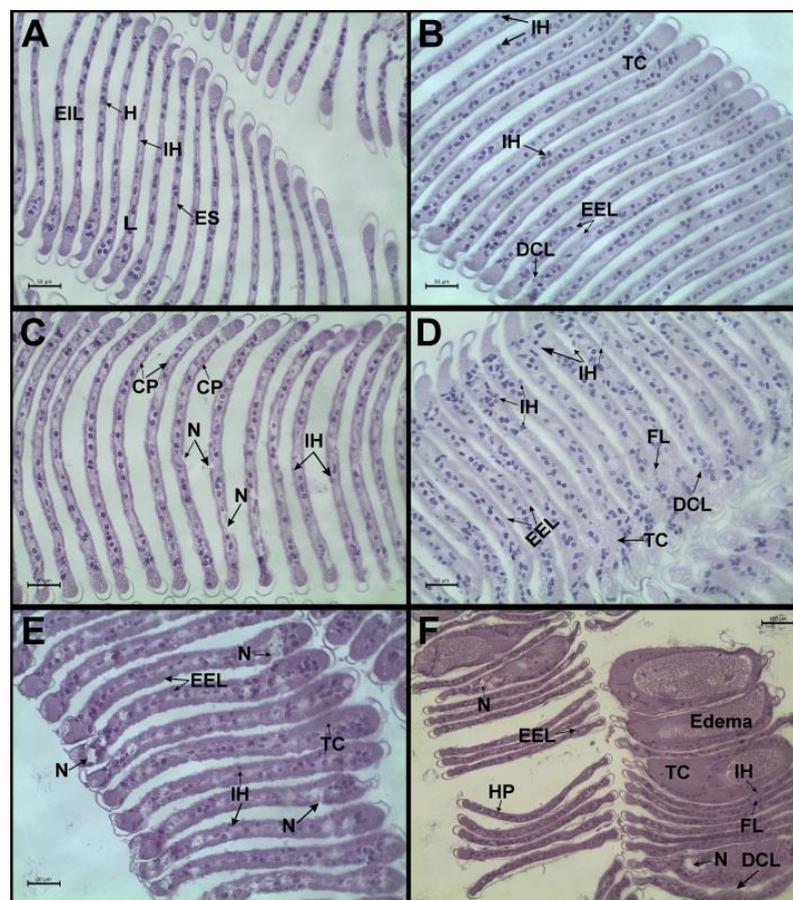


FONTE: DUTRA (2016).

No tratamento com 0 mg.L⁻¹ de amônia total (controle) foram observadas infiltração de hemócitos difusa leve no parênquima das lamelas branquiais, (Figura 4-A) e com 6% de mortalidade dos camarões e os restante eutanasiados ao final das 96 horas (Figura 3). No tratamento com 5 mg.L⁻¹, observou-se a presença de algumas alterações regressivas (inchaço da lamela, espessamento do epitélio lamelar, descamação da cutícula lamelar) e inflamação (infiltração de hemócitos) no corpo lamelar observa-se infiltração de hemócitos difusa moderada, com áreas multifocais leves de agregação de hemócitos. Nota-se espessamento do epitélio lamelar multifocal leve a moderado com tumefação lamelar difusa leve e com 10% de mortalidade (Figura 4-B) e o restante dos animais eutanasiados ao final das 96 horas (Figura 3). As inflamações e os danos regressivos foram as alterações mais encontradas no tratamento com 10 mg.L⁻¹ de amônia total, sendo estes danos infiltração de hemócitos e necrose, respectivamente. Nas lamelas brânquias observa-se infiltração difusa leve a moderada de hemócitos e áreas multifocais moderadas de agregação e hemócitos. Na base da lamela, dentro dos vasos da hemolinfa é possível visualizar marginação hemocitaria multifocal leve. Há descamação multifocal leve da cutícula lamelar e áreas multifocais leve de necrose epitelial. Nota-se redução multifocal leve do espaço interlamelar (Figura 4-C), neste grupo tivemos 10% de mortalidade, e o restante eutanasiados ao final das 96 horas (Figura 3). O tratamento com 20 mg.L⁻¹ teve maior prevalência de danos regressivos (inchaço da lamela, espessamento do epitélio lamelar, descamação da cutícula lamelar e fusão lamelar), e inflamação (infiltração de hemócitos). No corpo das lamelas branquiais observa-se infiltrado difuso acentuado de hemócitos com diminuição moderada do espaço interlamelar. Há tumefação lamelar difusa acentuada com agregação de hemócitos multifocal moderado. Por vezes na base das lamelas observa-se hiperplasia multifocal leve. Observa-se descamação multifocal moderada da cutícula lamelar. Os vasos de hemolinfa apresentam dilatação (hiperemia) multifocal à focalmente extensa moderada principalmente aqueles localizados na base da lamelar. (Figura 4-

D). A mortalidade destes animais chegou a 48% em 96 horas o restante dos animais foram eutanasiados ao final do experimento, (Figura 3). Na concentração de 40 mg.L^{-1} de amônia total observa-se que as alterações são representadas pela presença de danos regressivos com fator de baixa importância (w), com as seguintes alterações (tumefação celular, descamação do epitélio lamelar e espessamento do epitélio lamelar) e fator de alta importância (necrose), inflamação (infiltração de hemócitos). Nota-se descamação cuticular difusa acentuada associada à infiltração difusa moderada de hemócitos no corpo lamelar. As lamelas estão difusa e acentuadamente tumefeitas com redução multifocal moderada a acentuada do espaço interlamelar. Há fusão lamelar multifocal leve principalmente no ápice das lamelas branquiais. Nota-se uma área focalmente extensa difusa de espessamento do epitélio lamelar acentuada e áreas de necrose multifocal moderada nos ápices das lamelas. (Figura 4-E). Foram a óbito 100% dos crustáceos em 72 horas, (Figura 3). Nas concentrações de 80 mg.L^{-1} há uma prevalência de danos regressivos com altos valores nos escores do fator de importância (w), (necroses e descamação da cutícula lamelar, fusão lamelar, espessamento do epitélio lamelar, tumefação celular e edema), danos progressivos (hiperplasia) e inflamação (infiltração de hemócitos). Há edema lamelar multifocal a coalescente acentuado das lamelas branquiais associados a intenso edema e infiltração difusa moderada de hemócitos. Nessas lamelas observa-se intensa dilatação nos vasos de hemolínfa. A fusão lamelar é multifocal a focalmente extensa acentuada. Por vezes observa-se que a cutícula lamelar esta intensamente espessada e evidente. Há redução difusa acentuada do espaço interlamelar com tumefação lamelar moderada e necrose multifocais moderada das células epiteliais. como pode ser observado na (figura 4-F) os animais deste grupo 100% foram a óbito em 48 horas (Figura 3).

FIGURA 4 - BRÂNQUIA DE *M. AMAZONICUM* EXPOSTO A 0 MG.L⁻¹ DE AMÔNIA (CONTROLE). ESPAÇO HEMOCÍTICO (ES); LAMELA (L); HEMÓCITO (H); ESPAÇO INTER LAMELAR (EIL) E INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITOS (IH) (20X, H&E). B) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 5 MG.L⁻¹ DE AMÔNIA. TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO HEMÓCITOS (IH); ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL) E DESCAMAÇÃO DA CUTÍCULA LAMELAR (DCL). C) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 10 MG.L⁻¹ DE AMÔNIA. CÉLULAS PILARES (CP); NECROSE (N) E INFILTRAÇÃO HEMÓCITOS (IH) (20X, H&E). D) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 20 MG.L⁻¹ DE AMÔNIA. TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITOS (IH); FUSÃO LAMELAR (FL); ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL) E DESCAMAÇÃO DA CUTÍCULA LAMELAR (20X, H&E). E) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 40 MG.L⁻¹ DE AMÔNIA. NECROSE (N); TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITO (IH) E ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL) (20X, H&E). F) BRÂNQUIAS EXPOSTAS A 80 MG.L⁻¹ DE AMÔNIA. NECROSE (N); HIPERPLASIA (HP); FUSÃO LAMELAR (FL); DESCAMAÇÃO DA CUTÍCULA LAMELAR (DCL); ESPESSAMENTO DO EPITÉLIO LAMELAR (EEL), TUMEFAÇÃO CELULAR (TC); INFILTRAÇÃO DE HEMÓCITOS E EDEMA (10X, H&E)

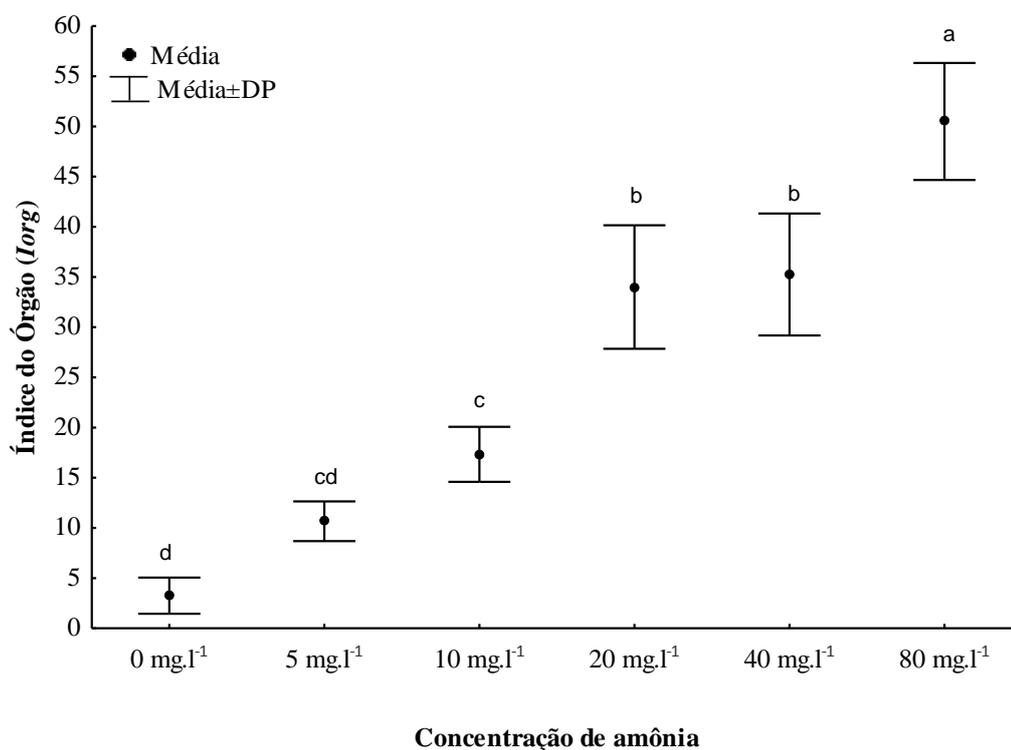


FONTE: O autor (2016).

Através da análise realizada nas brânquias de *M. amazonicum* submetidos a diferentes concentrações de amônia total utilizando o *Iorg* foi demonstrado que os índices encontrados nos tratamentos com 40 e 80 mg.L⁻¹ que apresentaram 100% de mortalidade em 72 horas e 48 horas respectivamente, são diferentes estatisticamente ($P < 0,05$), sendo os valores médios de índice do órgão de $34,0 \pm 6,2$ e $50,5 \pm 6,1$, respectivamente. O índice encontrado para a concentração de 20 mg.L⁻¹ de amônia total foi de $33,3 \pm 7,8$, com mortalidade de 48% em 96 horas, estatisticamente igual ao índice determinado para a concentração de 40 mg.L⁻¹ ($P < 0,05$).

O tratamento com concentração de 5 mg.L^{-1} não apresentou diferença significativa em relação ao tratamento controle ($P>0,05$) e foi estatisticamente igual ao tratamento com concentração de 10 mg.L^{-1} . Os índices de órgão para estes tratamentos foram respectivamente $10,7\pm 2,1$ e $17,3\pm 2,9$ enquanto para o tratamento controle o índice determinado foi de $3,7\pm 1,9$ (Figura 4).

FIGURA 5 - ÍNDICE DO ÓRGÃO (MÉDIA \pm D.P) DE JUVENIS DE *MACROBRACHIUM AMAZONICUM* EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AMÔNIA TOTAL DURANTE 96 HORAS



FONTE: O autor (2016).

4 DISCUSSÃO

No presente experimento as variáveis liminológicas avaliadas permaneceram dentro da faixa recomendada para a produção de *M. amazonicum*. A temperatura permaneceu entre 22-31 °C, a concentração de oxigênio dissolvido entre 4,6 e 6,1 mg.L⁻¹ e o pH variando entre 7,4-8,4 conforme recomendado por Sampaio et al. (2007), a alcalinidade entre 20 a 60 mg.L⁻¹ de CaCO₃ (NEW, 2002) e a dureza registrada ficou entre 20 - 200 mg.L⁻¹ de CaCO₃ (VASQUEZ et al. 2007) e. Os níveis de nitrito e nitrato se mantiveram abaixo dos níveis sugeridos por Timmons et al. (2002), que recomendou um valor limite para o nitrito de 1 mg.L⁻¹ na aquicultura. Moraes-Valenti e Valenti (2010) ressaltam que os valores de nitratos não devem atingir níveis acima de 80 mg.L⁻¹. Portanto, as variáveis de qualidade de água não foram limitantes ou estressantes para os camarões. Assim, pode-se argumentar que as alterações nas brânquias observadas foram devido aos níveis de amônia avaliados.

No presente estudo foram observadas alterações na estrutura das brânquias com o aumento da concentração de amônia, as alterações encontradas foram tumefação celular, infiltração de hemócitos, fusão lamelar, espessamento do epitélio lamelar, necrose, hiperplasia, descamação da cutícula lamelar e edema.

Tumefação celular é causada pelo acúmulo intracelular de água decorrente da falha no transporte ativo, na hipóxia e lesões tóxicas, aparecendo sempre que as células são incapazes de manter a homeostase iônica e hídrica, com característica opaca obscurecimento de estruturas intracelulares e, à medida que a quantidade de água aumenta, o volume da lamela aumenta formando vacúolos no citoplasma. (COTRAN et al. 2000; WENER, 2010)

As estruturas branquiais são formadas principalmente por células pilares, epitélio lamelar, hemócitos e líquido hemocítico, o epitélio lamelar da brânquia é a principal superfície de contato com o meio externo (WONG; WONG, 2000). As células pilares apresentam base e extremidades apicais largas, têm a função de sustentação do órgão e circulação da hemolinfa (VALENTIM-NETO, 2004). Quando à ruptura das células pilares ocorre um comprometimento da capacidade de suporte, e circulação. O epitélio lamelar apresenta forma geralmente fina, circundada por uma cutícula quitinosa e espessamento na porção basal e distal do filamento branquial. Os hemócitos apresentam forma arredondada, tendo função de transporte de gases e de defesa imunológica, removendo partículas estranhas seguida de uma combinação de fagocitose e uma reação de encapsulação, dependendo nas dimensões do corpo estranho (THOPHON et al. 2003; SANTOS, 2007; SOEGIANTO et al. 1999a). O edema se

caracteriza pelo acúmulo de líquido plasmático na estrutura celular (LOZANO OLVERA et al 2012).

Segundo Werner (2010), quando as brânquias são expostas a determinadas concentrações de agentes tóxicos com duração de minutos ou até mesmo alguns dias, ocorrem lesões com respostas inflamatórias caracterizando uma inflamação aguda que é uma reação básica de defesa. Este tipo de inflamação pode ser inativado através de mediadores químicos como a migração dos hemócitos, presentes na hemolinfa, e a exsudação de líquido que se dá pelo processo de liberação de líquidos através das paredes e membranas celulares, determinando a respostas a intensidade e a persistência do estímulo lesivo que o desencadeou isolando o agente agressor (GARCIA-LEME, 1989). Portanto a inflamação não é uma doença, mas uma resposta inespecífica que tem um efeito salutar sobre o hospedeiro, Julius Cohnheim (1839-1884), atado por Cotran et al. 2000. Essas alterações histológicas funcionam como mecanismos de defesa, diminuindo a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentando a barreira de difusão ao poluente. (KARLSSON-NORRGREN et al. 1985; ERKMEN; KOLANKAYA, 2000).

A hiperplasia está entre as primeiras alterações que surgem quando há um aumento na concentração de amônia ambiental, caracterizando-se pelo aumento na proliferação das células no epitélio a qual pode levar à fusão lamelar e rompimento das células pilares (KARASU-BENLI; KÖKSAL, 2005). Essa alteração é considerada um tipo de lesão progressiva e muitas vezes irreversível, que envolve o rompimento do sistema de células pilares, como observado em *Piaractus mesopotanicus* por Pádua et al. (2013). A descamação epitelial e hiperplasia são alterações irreversíveis e inespecíficas, que podem servir como defesa (HINTON et al. 1992; OJHA, 1999), pois a regeneração celular diminuem a área de superfície vulnerável da brânquia e/ou aumentam a barreira de difusão ao poluente (KARLSSON-NORRGREN et al. 1985; FREITAS, 2013).

A descamação da cutícula lamelar, hiperplasia e fusão lamelar são conhecidas por serem alterações inespecíficas que podem ser causadas por uma variedade de estressores, tais como metais pesados, amônia, fenóis, infecções por microrganismos e presença de ectoparasitos (MALLAT, 1985; HINTON; LAURÉN, 1990; HINTON et al. 1992). Mallatt (1985) afirmou que o inchaço e a descamação da cutícula lamelar e a ocorrência de hiperplasia em lamelas pode simplesmente refletir uma adaptação fisiológica ao estresse. Já a necrose é a morte celular que leva a ruptura do epitélio lamelar e aumento da substituição celular e da regeneração epitelial (PELGROM et al., 1995) são lesões que refletem o efeito

direto dos poluentes (TEMMINK et al. 1983; SANTOS, 2007) e que ocorrem em condições de maior toxicidade (ABEL et al. 1976; MONTEIRO, 2001; SANTOS, 2007).

Ao observar as análises do Índice do Órgão (*Iorg*), realizadas através do levantamento das alterações presentes nas análises histológicas das brânquias submetidas à amônia, e compará-las com os resultados de mortalidade com camarão *M. amazonicum* reportados por Dutra et al. (2016), observou-se que os maiores índices são aqueles que provocaram maior alteração na estrutura branquial e como consequência maior mortalidade. A principal diferença no tratamento com 80 mg.L⁻¹ onde 100% dos camarões foram a óbito em 48h, foi a caracterização de edema e outros danos regressivos em relação ao tratamento com 40 mg.L⁻¹, onde a mortalidade foi de 100% em 72 horas, porém sem edema marcante.

A necrose, caracterizada pelo rompimento do epitélio lamelar foi a alteração predominante na morfologia branquial seguida de descamação da cutícula lamelar dos camarões expostos a 80 mg.L⁻¹ de amônia. Para os tratamentos de 20 e 40 mg.L⁻¹ a descamação da cutícula lamelar seguida lesão de necrose foi a alteração predominante. Os tratamentos com 20 e 40 mg.L⁻¹ não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os índices do órgão, entretanto, Dutra et al. (2016) reportaram diferença significativa nos índices de mortalidade entre estes tratamentos ($P < 0,05$). A explicação para isso provavelmente está relacionada ao maior tempo de exposição ao agente tóxico ocasionando maior extravasamento de hemócitos, o que acarreta em processos inflamatórios mais acentuados e a presença de danos regressivos no tratamento 20 mg.L⁻¹, que faz com que o índice se eleve, sem causar altas taxas de mortalidade. Os resultados apontam que a tolerância do *M. amazonicum* diminui com o aumento do tempo de exposição, pois excede a capacidade de excreção.

Outra diferença que pode explicar este efeito é a mudança nos danos regressivos, uma vez que o tratamento com 40 mg.L⁻¹ apresentou maiores *scores* de fator de importância (*w*) nos danos regressivos do que o tratamento com 20 mg.L⁻¹. Para estes tratamentos, quando avaliamos e comparamos com índice do órgão, em conjunto com as imagens dos cortes histológicos, este não corrobora os resultados encontrados por Dutra et al. (2016) no teste de mortalidade. Por outro lado, fica evidente que a gravidade dos efeitos degenerativos causados à brânquia pela exposição à amônia evoluiu, significativamente com o aumento da concentração do composto tóxico e com o aumento do tempo de exposição do organismo a essa substância.

Estudos que avaliam o efeito da amônia em brânquias de crustáceos são escassos, entretanto, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo foram registrados por Rebelo et al. (2000) com a espécie *Granulata chasmagnathus* onde os caranguejos foram expostos a amônia total nas concentrações (0, 16,5 e 27,5 mM), durante 96h. Neste trabalho as

lesões foram significativamente maiores ($P < 0,05$) em caranguejos expostos a concentrações mais elevadas apresentando os seguintes resultados: necrose epitelial e hiperplasia. Romano e Zeng (2007) submeteram juvenis de *Portunus pelagicus* (siri) em diferentes estágios de vida, a diferentes concentrações de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg.L^{-1} de amônia total por 96h. Os resultados demonstraram que a tolerância aumentou significativamente ($P < 0,01$) com o desenvolvimento ontogênico dos crustáceos. Entretanto, para todas as fases de vida do animal, os autores determinaram que a gravidade das alterações morfológicas e fisiológicas nas lamelas brânquias, incluindo extensa infiltração de hemócitos, necrose e alterações epiteliais, foram agravadas o aumento das concentrações de amônia.

Por outro lado, diversos trabalhos avaliaram a exposição de camarões do gênero *Macrobrachium* a diferentes agentes tóxicos, como o estudo realizado por Victor et al. (1990) que relataram danos as estruturas brânquias da espécie *Macrobrachium idea*, como hiperplasia, tumefação celular e infiltração de hemócitos expondo estes camarões durante 30 dias sob ação a 1 mg.L^{-1} de mercúrio.

Li et al. (2007) observaram que *M. rosenbergii* exposto a diferentes concentrações subletais de cobre, que variaram de 0,01 mg.L^{-1} a 0,4 mg.L^{-1} , em um período de 7 dias, apresentaram alterações estruturais como: tumefação celular e fusão das lamelas, acumulação de hemócitos, descamação da cutícula lamelar e necrose. Kaoud et al. (2011) ao avaliarem a exposição de *M. rosenbergii* a diferentes concentrações de mercúrio, também observaram agravamento nos danos a estrutura branquiais conforme o aumento da concentração. Os animais foram expostos a sete diferentes concentrações (0, 10, 50, 100, 200, 300, 400 e 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$), as taxas de mortalidade de camarões expostos a concentrações de mercúrio de 10 e 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foram significativamente menores ($P < 0,05$) do que aquelas expostas a concentrações mais altas (100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou maiores). Na análise histológica as brânquias dos camarões expostos a baixas doses de mercúrio apresentaram, tumefação celular e edema, já os animais expostos a doses maiores apresentaram edema grave e hiperplasia, acumulação de hemócitos no espaço hemocítico, alterações nas extremidades das brânquias, necrose e aglomeração de hemócitos nas lamelas brânquias.

Kaoud e Rezk (2011) submeteram *M. rosenbergii* a diferentes concentrações de cádmio durante 96h, a sobrevivência dos camarões expostos a concentrações de 10-50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que para camarões expostos a maiores concentrações (60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ou mais), mas não foram significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$). Em doses mais baixas de cádmio, as brânquias apresentaram inchaço e edema, nas doses mais elevadas, edema grave e hiperplasia. Soegianto et al. (2013) realizou estudo com cádmio utilizando a espécie

Macrobrachium sintangese, as concentrações avaliadas foram 0,10; 31,62; 100; 316,2; 1000,3162 e 10000 g.L^{-1} . Foram realizadas observações a cada 24 horas até o final do experimento (96h) para registrar a mortalidade e fazer a remoção dos camarões mortos. O maior acúmulo de cádmio foi observada nas brânquias, seguida pelo hepatopâncreas e pelo músculo abdominal. Após a transferência para meios livres de cádmio, observou-se a maior eliminação de cádmio no músculo abdominal, seguida das brânquias e do hepatopâncreas. As brânquias dos camarões expostos ao cádmio apresentaram hiperplasia grave, aglomeração de hemócitos e necrose múltipla, que resultaram no inchaço das lamelas. Mostrando que a tolerância de *M. sintangese* ao cádmio diminuiu com o aumento do tempo de exposição.

Danos teciduais causados a brânquias de camarões por outros agentes tóxicos também foram estudados em camarões do gênero *Macrobrachium*, como exemplo, Saravana Bhavan e Geraldine, (2000) submetem *Macrobrachium malcomsonii*, a três concentrações subletais do pesticida organoclorado Endosulfan, (10,6; 16,0 e 32,0 mg.L^{-1}) durante 21 dias. Este pesticida causou: infiltração de hemócitos, espessamento das lâminas basais, acúmulo de hemócitos no espaço hemocítico, inchaço e fusão de lamelas, alterações nas extremidades das brânquias, hiperplasia, necrose e aglomeração de hemócitos nas brânquias dos camarões.

Chang et al. (2006) submetem *M. rosenbergii* a diferentes doses do parasiticida Triclorfom (0, 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg L^{-1}) para determinar a dose letal para 50% da população (LC_{50}) para 24, 48, 72 e 96h. Na concentração 0,6 mg.L^{-1} os camarões foram a óbito após 96h e os expostos a 0,8 mg.L^{-1} , morreram após 72h. Foram relatadas as seguintes alterações branquiais: infiltração de hemócitos no espaço hemocítico, inchaço e fusão das lamelas, necrose, hiperplasia e glomerado de hemócitos branquiais.

Em estudos onde os camarões foram expostos a radiação ionizante também foram encontradas alterações semelhantes às encontradas no presente trabalho. Stalin et al. (2013), utilizou a espécie *M. rosenbergii*, para testar os limites de exposição à radiação ionizante, onde os camarões foram expostos aos níveis de 0; 2,97; 29,33; 297,23 e 2992,00 de mGy, irradiados usando Unidade de TeleCobalt Theratron Phoenix (P-33), o órgão utilizado para avaliação dos efeitos da radiação foi as brânquias. Não foram observadas mortalidades para nenhum dos níveis de radiação avaliados, entretanto foram encontradas as seguintes alterações histológicas: acúmulo de hemócitos em espaços hemocítico, alterações nas extremidades das brânquias, descamação da cutícula lamelar, lamelas inchadas e fusão lamelar, hiperplasia, necrose, aglomeração de hemócitos e desorganização completa de lamelas. As alterações histológicas mais graves foram encontradas no nível de dose mais elevada de radiação.

Nos trabalhos citados acima, todos os autores afirmam que devido à principal via de contato com o meio externo dos camarões ser a brânquia, ela se torna o alvo principal dos compostos tóxicos. Alterações como tumefação celular, espessamento do epitélio lamelar, hiperplasia e acúmulo de hemócitos, podem refletir uma adaptação ao estresse causada pela exposição à substância tóxica, levando a um espessamento do epitélio lamelar, aumentando assim a distância entre o meio interno e externo (MALLATT, 1985; NEGRO et al. 2011). A análise histológica, portanto, se apresenta como uma ferramenta útil para a compreensão das alterações morfofisiológicas nas brânquias dos camarões que levam a distúrbios ou até mesmo a morte dos crustáceos expostos a compostos tóxicos.

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho demonstraram que as brânquias de *M. amazonicum* sofreram alterações devido à exposição a níveis crescentes de amônia e que estas alterações foram agravadas pelo aumento da concentração e do tempo de exposição ao composto tóxico.

REFÊRENCIAS

- ABEL, P.D. Toxic action of several lethal concentrations of an anionic detergent on the gills of the brown trout (*Salmo trutta* L.). **Journal of Fish Biology**, England, v.9, p.441-446, 1976.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos de qualidade de água em aquicultura**: uma revisão para peixes e camarões. Florianópolis: UFSC, 1997. 166 p.
- ARANA, L.V. **Qualidade da água em aquicultura – princípios e práticas**. 3ª edição. Florianópolis: Editora UFSC, 2010.
- ARAÚJO, M.C.; VALENTI, W.C. Efeito da intensidade luminosa no desenvolvimento larval do camarão-da-amazônia, *Macrobrachium amazonicum*. **Boletim do Instituto de Pesca**, 37(2) 155-164, 2011.
- ASIH, A.Y.P. et al. Effect of copper on survival, osmoregulation, and gill structures of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*, de Man) at different development stages. **Marine and Freshwater Behaviour and Physiology**, Indonesia 46, 75-88, 2013. doi:10.1080/10236244.2013.793471.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2.ed. Santa Maria: Editora da UFSM, 2011. 608p.
- BEN-KHEDHER, S. et al. Metals bioaccumulation and histopathological biomarkers in *Carcinus maenas* crab from Bizerta lagoon, **Environmental Science and Pollution Research** 21, Tunisia, 4343-4357, 2014. doi:10.1007/s11356-013-2399-x.
- BERNET, D. et al. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases** 22, 25-34, 1999. doi:10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- BELL, T.A.; LIGHTNER, D.V. **A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology**. **World Aquaculture Society**, Baton Rouge, LA, USA, 114 pp, 1988.
- CHANG, C.C., et al. Survival, and biochemical, physiological, and histopathological responses of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, to short-term trichlorfon exposure. **Aquaculture**, 253, 653-666, 2006. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.05.011.
- COSTA P.M., CARREIRA, S., COSTA M.H., CAEIRO, S.,. Development of histopathological indices in a commercial marine bivalve (*Ruditapes decussatus*) to determine environmental quality. **Aquatic Toxicology**. 126, 442–454, 2013. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.08.013.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins Patologia Estrutural e Funcional**. Revisão Técnica desta edição João lobato dos Santos e Wilhermo Torres. Tradução Jane Bardawil barbosa et al. 6.ed. Guanabara Koogan S.A., 2000. 45 p. Título original: Robbins Pathologic Basic of Disease.

DUTRA F.M. et al. Acute toxicity of ammonia to various life stages of the amazon river prawn, *Macrobrachium amazonicum*, Heller, 1862. **Aquaculture** 453, 104-109, 2016. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.11.038.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinc* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.64, p.418-425, 2000.

EVANS, D.H. et al. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews** 85, 97–177 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. Global Aquaculture Production 1950-2014. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>>. Acesso em: Mai. 2016

FREITAS, A.R. et al. Avaliação das brânquias de *danio rerio* expostos a diferentes concentrações de r. gasolina e diesel. *Pesticidas: ecotoxicol e meio ambiente, uritiba*, v. 23, p. 59-66jan/dez. 2013.

GARCIA-LEME, J. **Hormones and Inflammation**, p.1-238, CRC Press, Boca Raton, 1989.

HENRY, R.P. et al. Multiple functions of the crustacean gill: osmotic/ionic regulation, acid-base balance, ammonia excretion, and bioaccumulation of toxic metals. **Frontiers in Physiology**, USA 3, 1-33, 2012. doi:10.3389/fphys.2012.0043

HINTON, D.E. et al. Histopathologic biomarkers. Pages: 155 –196 in: R.J. Huggett. R.A. Kimerli, P.M. Mehrle Jr., and H.L. Bergman, editor. Biomarkers. Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. **Lewis Publishers**, Boca Ratón, FL, USA, 1992.

HINTON, D.; LAURÉN, D. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. **Am. Fish. Soc. Symp**, v.8, p.51-66, 1990.

IBAMA. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos: teste para avaliação da mobilidade. 2^o ed. Brasília, DF. http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/manual_de_procedimento_agr_otoxicos_ibama_2009-11.pdf. Acesso em: 17 nov. 2016.

IKETANI G. et al. Successful invasion of the Amazon Coast by the giant river prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: evidence of a reproductively viable population. **Research Article**, Brasil, vol, II, 277-286, 2016.

KARASU-BENLI, A.C.; KÖKSAL G. The acute toxicity of ammonia on tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 29: 339-344, 2005.

KARLSSON-NORRGREN, L. et al. Cadmium-induced changes in gill morphology of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-uchanan) and rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. **Journal of Fish Biology**, v.27, p.81- 95, 1985.

KAUD, H.A. et al. Effect of Exposure to Mercury on Health in Tropical *Macrobrachium Rosenbergii*. **Life Science Journal** 8, 154-163, 2011.

KAUD, H.A.; REZK, A. Effect of exposure to cadmium on the tropical freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. **African Journal of Aquatic Science**, 36, 253-260, 2011. doi:10.2989/16085914.2011.636899.

KIR; M.; KUMLU, M.; EROLDG, O. T. **Effects of temperature on acute toxicity of ammonia to *Penaes semisulcatus* juveniles**. *Aquaculture*. n. 241. p. 479–489. 2004.

KUTTY, M.N.; HERMAN, F.; LE MENN, H. Culture of other prawn species. In: NEW, M.B. e VALENTI, W.C. *Freshwater prawn culture: The farming of *Macrobrachium rosenbergii**. **Oxford: Blackwell Science**. cap. 21, p.393-410, 2000.

Li, N.; Zhao, Y.; Yang, J. Impact of Waterborne Copper on the Structure of Gills and Hepatopancreas and Its Impact on the Content of Metallothionein in Juvenile Giant Freshwater Prawn *Macrobrachium rosenbergii* (Crustacea: Decapoda). **Archives of Environment Contamination and Toxicology**, 52, 73-79, 2007. doi: 10.1007/s00244-005-0214-5.

LIGNOT, J.-H.; TRILLES, J.-P.; CHARMATIER, G. Effect of an organophosphorus insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaes japonicus* (Crustacea: Decapoda). **Marine biology**, 128, 307-316, 1997. doi:10.1007/s002270050096.

LOZANO OLVERA, R., MARRUJO LÓPEZ, F. I. Y ABAD ROSALES, S. M. Necrosis cuticular en camarón *Litopenaeus vannamei* asociada a *Fusarium* sp. (Cuticular necrosis in shrimp *Litopenaeus vannamei* associated with *Fusarium* sp). **RedVet**, v.13 N° 7, 2012 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070712.html>.

LUCENA-FREDOU, F.; ROSA, J. S.; SILVA, M.C.N & AZEVEDO E.F. Population dynamics of the River prawn, *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) (Decapoda, Palaemonidae) on Combu island (Amazon estuary). **Crustaceana** 83: 277-290, 2010.

MALLAT, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and their irritants: a statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 42, 630-648, 1985. doi: 10.1139/f85-083.

MARQUES, H.L.A.; MORAES-VALENTI, P. M.C. Current status and prospects of farming the giant river prawn (*macrobrachium rosenbergii*(de Man 1879) end the Amazon river prawn (*Macrobrachium amazonicum* (Heller 1862). **Aquaculture Research**, Brasil, 43,984-992, 2012.

MARTINEZ, C.B.R.; E I.M. CÓLUS. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi. p. 551-577 in M.E. Medri, E.

Bianchini, O. A. Shibatta, and J. A. Pimenta, editors. **A Bacia do Rio Tibagi**. Edição dos Editores, Londrina, PR. 2002.

MIRON, D.S. et al. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). **Aquaculture** 277, 192-196, 2008. doi:10.1016/j.aquaculture.2008.02.023.

MONTEIRO, S.M. **Caracterização ultraestrutural do epitélio da brânquia de *O. niloticus*: Efeitos da exposição ao cobre**. (Mestrado) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, 162f, 2001.

MORAES-VALENTI, P.M.C.; VALENTI, W.C. **Culture of the Amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum***. In: M.B. New, W.C. Valenti, J.H. Tidwell, L.R. D'Abramo & M.N. Kutty (Eds.), *Freshwater Prawns: Biology and Farming*. Wiley-Blackwell, Oxford, p. 485-570, 2010.

MUGNIER, C.; JUSTOU, C. **Combined effect of external ammonia and molt stage on the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* physiological response**. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. n. 309. p. 35– 46, 2004.

NEGRO L.E.; MONTAGNA, M.; COLLINS, P. **Freshwater Decapods and Pesticides: An Unavoidable Relation in the Modern World**, in: Stoytchera, M. (Ed.), *Pesticides in the Modern World: Risks and Benefits*. **InTech**, Croatia, pp. 560, 2011.

NEW, M. B. **Farming freshwater prawns: A manual for the culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)**. **FAO Fisheries Technical Paper**, Rome. p. 212, 2002.

OJHA, J. **Fish gills: potential indicators of ecodegradation of aquatic environments**. In: MITTAL, A. K.; EDDY, F. B.; DATTAMUNSHI, J. S. (Editores). *Water/air transition in biology*. E.U.A.: **Science Publishers**, cap. 18, p. 263 – 279, 1999.

PÁDUA, S.B. **First record of *Chilodonella hexasticha* (Ciliophora: Chilodonellidae) in Brazilian cultured fish: a morphological and pathological assessment**. **Veterinary Parasitology**, 191: 154-160, 2013

PAZIR M.K. **Detection and identification of white spot syndrome virus (WSSV) and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) of *Litopenaeus vannamei* from Bushehr and Sistan and Baloochestan provinces, Iran, during 2009-2010**. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10, 708- 726, 2011.

PELGROM, S.; LAMERS, L.; LOCK, R.; et al. **Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure**. **Aquatic Toxicol.**, v.32, p.303-320, 1995.

PEYGHAN, R.; AZARY TAKAMI G. **Histopathological, serum enzyme, cholesterol and urea changes in experimental acute toxicity of ammonia in common carp *Cyprinus carpio* and use of natural zeolite for prevention**. **Aquaculture International**, 10: 317-325. 2002.

ROMANO, N.; ZENG, C. Ontogenetic changes in tolerance to acute ammonia exposure and associated gill histological alterations during early juvenile development of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*. **Aquaculture**, v.266, 1-4, p. 246-254, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.035>.

REBELO, M.F. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea-Decapoda) following acute exposure to ammonia. **Science Direct**, v. 125, 157–164, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413\(99\)00093-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0742-8413(99)00093-6).

SANTOS, G.S. et al. Histological alterations in gills of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* caused by cadmium. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** vol.59 no.2 Belo Horizonte Apr. 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352007000200017>.

SAMPAIO, C. M. S. et al. Reproductive cycle of *Macrobrachium amazonicum* females (Crustacea, Palaemonidae). **Braz J Biol.** 67:551–559, 2007.

SARAVANA BHAVAN, P.; GERALDINE, P. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. **Aquatic Toxicology** 50, 331-339, 2000. doi:10.1016/S0166-445X(00)00096-5.

SOKAL, R.R.; ROLHF, F.J. Biometry: Principle and practices of statistics in biological research, fourth ed. W.H. Freeman & Company, New York, 1969.

STALIN, A. et al. Effects of ⁶⁰Co gamma irradiation on behavior and gill histoarchitecture of giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 92, 155-160, 2013. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.03.015.

SOEGIANTO A. Impact of cadmium on the structure of gills and epipodites of the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). **Aquat Living Resour** 12:57–70, 1999a. doi:10.1016/S0990-7440 (99)80015-1.

SOEGIANTO, A. et al. Bioaccumulation, Elimination, and Toxic Effect of Cadmium on Structure of Gills and Hepatopancreas of Freshwater Prawn *Macrobrachium sintangense* (De Man, 1898). **Water, Air, & Soil Pollution** 224, 1-10, 2013. doi:10.1007/s11270-013-1575-4.

TEMMINK, J. et al. An ultrastructural study of chromate-induced hyperplasia in the gills of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Aquatic Toxicol.**, v.4, p.165-179, 1983.

TIMMONS, M. B. et al. Recirculating Aquaculture System, 2 nd Ed. Ithaca, **Cayuga Aquaculture Ventures**, 769 p, 2002.

THOPHON, S. et al. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environ. Pollut.**, v.121, p.307-320, 2003.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO P.C.F. Práticas de manejo e estresse dos peixes em piscicultura. Páginas 171-193 in J.E.P. Cyrino, E.C. Urbinati, D.M. Fracalossi, and N. Castagnolli, editores.

Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. **Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática** (Aquabio). Jaboticabal, SP. 2004.

USMAN N.; IRAWAN B.; SOEGIANTO A. Effect of copper on survival and osmoregulation in different life stages of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). **Cah Biol Mar.** 54:191–197, 2013.

VALENTIM-NETO, P.A. **Possíveis causas da mortalidade do carangueijo-uçá, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) no estuário do rio Jaguaribe** – Ceará, 2004. 78 f. Dissertação (Dissertação de mestrado em Ciências Tropicais). Instituto de Ciências do Mar Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2004.

VASQUEZ, O. E.; ROUSE, D. B.; ROGERS, W.A. Growth Response of *Macrobrachium rosenbergii* to Different Levels of Hardness. **Journal of the World Aquaculture Society.** 20(2): 90-92, 2007.

VICTOR, B.; NARAYANAN, M.; NELSON, D.J. Gills pathology and hemocyte response in mercury exposed *Macrobrachium idea* (Heller). **Journal of Environmental Biology** 11, 61-65, 1990.

VITULE, J. R. S.; FREIRE, C. A.; SIMBERLOFF, D. Introduction of non-native freshwater fish can certainly be bad. **Fish and Fisheries** v.10, n.1, p. 98–108, 2009.

WERNER, PEDRO R. **Patologia Geral Veterinária Aplicada**. São Paulo: Roca, 2010.233-243 p.

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

YUN, J.M. ET AL. Artificial infection of the native korean freshwater prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849) (decapoda, *Palaemonidae*) with White Spot Syndrome Virus (WSSV). **Crustaceana** 87, 866-880, 2014. doi:10.1163/15685403-00003327.